

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Vlasta Doričová

Vliv přítomnosti proteinu HSP70 na infekci způsobenou Y virem bramboru

The effect of HSP70 protein on the infection caused by Potato virus Y

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Hýskové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, _____

Podpis

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za rady, ochotu, trpělivost a pomoc při řešení této diplomové práce. Stejně tak děkuji doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za veškeré poskytnuté rady. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc. za poskytnutý rostlinný materiál a protilátku proti viru PVY^{NTN} a Renátě Hadámkové za pomoc při provedení teplotního šoku a virové infekce. Děkuji také své rodině a příteli za podporu a pomoc v průběhu mého studia.

Abstrakt:

Rostliny jsou ve svém přirozeném prostředí často vystaveny působení více stresových faktorů najednou. Při kombinaci stresových podmínek se signální dráhy, kterými rostlina odpovídá na jednotlivé stresové faktory mohou navzájem ovlivňovat, čímž vzniká úplně nová odpověď rostliny vůči působení kombinace stresových faktorů. Teplotní stres zvýšenou expresí proteinů teplotního šoku (HSP70) ovlivňuje průběh virové infekce. Na jednu stranu se HSP70 mohou podílet na opětovném sbalení poškozených proteinů, na druhou stranu tyto proteiny mohou interagovat s virovými proteiny a usnadňovat propagaci replikačních komplexů viru.

Ve dvou biologických pokusech byl v této diplomové práci sledován vliv teplotního šoku (42°C, 2 hod.) aplikovaného před nebo po inokulaci Y virem bramboru (PVY^{NTN}) na průběh virové infekce v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. V rostlinách bylo detekováno množství obalového proteinu PVY^{NTN}, proteinů HSP70 a sledovány aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas a peroxidasy.

Oba způsoby provedení kombinovaného stresu (teplotní šok aplikovaný před nebo po inokulaci PVY^{NTN}) zvyšovaly množství viru v rostlinách a ve druhém pokusu urychlily dosažení maxima virové infekce. Teplotní šok zvýšil množství proteinů HSP70 bezprostředně po jeho aplikaci. Ke zvýšení množství proteinů HSP70 vlivem virové infekce docházelo až v pozdějších fázích stresu (14.–28. den po inokulaci). Ve skupinách rostlin vystavených jak kombinovanému stresu tak samotné virové infekci došlo ke zvýšení aktivit enzymů Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas a peroxidasy. Rozdíl v indukci aktivity však nebyl významný, což může naznačovat, že k synergickému účinku mezi příslušnými signálními kaskádami obranných odpovědí nedochází.

Klíčová slova:

kombinace stresových faktorů, teplotní šok, HSP70, Y virus bramboru, enzymy Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas, peroxidasa

Abstract:

Whithin their natural environment, plants are subjected to a combination of stress conditions. Since potential interactions between signal pathways, plants respond to multiple stresses differently from how they do to individual stresses, activating a specific programme. Heat shock proteins (HSP70) overexpressed after heat shock influence the viral infection. On one side HSP70 can participate on refolding of aggregated or partially denaturated proteins, on the other side HSP70 can interact with viral proteins and facilitate propagation of viral replication complexes.

In this work the effect of heat shock (42°C, 2. hours) applied before or after the inoculation of plants *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 with Potato virus Y on viral infection was detected. This effect was studied in two biological experiments. The amount of coat protein of PVY^{NTN} and protein HSP70 were detected simultaneously with the activity assays of Hatch-Slack cycle enzymes, glycosidases and peroxidase.

Both experimental approaches (heat shock applied before or after the inoculation by PVY^{NTN}) enhanced amount of the virus and in the 2nd experiment it accelerated infection development. Immediately after application of heat shock the amount of HSP70 was increased. The enhancement of HSP70 by viral infection occurred later (14.-21. days after inoculation). Activities of Hatch-Slack enzymes, glycosidases and peroxidase were increased in both, plants exposed to combination of stress and plants only inoculated by PVY^{NTN}, respectively. Small differences between these enzyme activities indicate that the synergic effect was not probably involved in particular signal pathways of defense responses. (In czech)

Keywords:

combination of stress factors, heat shock, HSP70, Potato virus Y, Hatch-Slack cycle enzymes, glycosidases, peroxidase

Použité zkratky:

42Y – skupina rostlin nejdříve vystavených teplotnímu šoku, a poté inokulovaných virem PVY^{NTN}

ABA – kyselina abscisová

ADP – adenosindifosfát

ATP - adenosintrifosfát

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát

BSA – hovězí sérový albumin

CP – obalový protein (z angl. coat protein)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DREB – transkripční faktor (z angl. dehydration response element)

DTT - dithiothreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ER – endoplazmatické retikulum

HR – hypersenzitivní reakce

HS – teplotní šok

HSF – transkripční faktor teplotního šoku

HSP – protein teplotního šoku

K20 – kontrolní skupina rostlin

K42 – skupina rostlin vystavená teplotnímu šoku (42°C, 2 hod.)

MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkinasa

MBF1c – transkripční faktor teplotního šoku (z angl. multiple-bridging factor 1c)

NAD(H) – nikotinamidadeninukleotid (redukovaný)

NADP(H) – nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)

NADP-ME – NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

NBT – nitrobluetetrazolium chlorid

PAL – fenylalaninamoniumlyasa

PEPC – fosfoenolpyruvátcarboxylasa

PPDK – pyruvát, fosfátdikinasa

PR – proteiny spojené s patogenezí (z angl. pathogenesis-related proteins)

PVP – polyvinylpolypyrrolidon

PVY – Y virus bramboru

ROS – reaktivní formy kyslíku

RubisCO – ribulosabifosfátkarboxylasa/oxygenasa

SA – kyselina salicylová

siRNA – malá interferující RNA (z angl. small interfering RNA)

SnRK – proteinkinasa příbuzná SNF1 (z angl. SNF1-related protein kinase, SNF1 – z angl. sucrose non-fermenting 1)

TEMED – N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

Y20 – skupina rostlin infikovaných virem PVY^{NTN}

Y42 – skupina rostlin nejdříve inokulovaných virem PVY^{NTN}, a poté vystavených teplotnímu šoku (42°C, 2 hod.)

Obsah

1. Úvod	3
1.1. Kombinace biotického a abiotického stresu	3
1.1.1. Kombinace teplotního a biotického stresu	3
1.1.2. Kombinace stresu ovlivňujícího vodní rovnováhu rostlin a biotického stresu	4
1.1.3. Kombinace dalších abiotických a biotických stresových faktorů	5
1.2. Virová infekce	6
1.2.1. Potyviry	6
1.2.2. Y virus bramboru (PVY)	6
1.2.3. Vstup rostlinných virů do buňky	8
1.2.4. Replikace a translace genetické informace rostlinných virů	9
1.2.5. Systémová infekce	10
1.3. Proteiny HSP70	11
1.3.1. Struktura proteinu HSP70	11
1.3.2. Funkce proteinu HSP70	12
1.4. Interakce proteinu HSP70 s virovými částicemi	14
1.4.1. Interakce proteinu HSP70 s virovými částicemi během jejich replikace a transportu	14
1.4.2. Pozitivní účinek proteinu HSP70 na rostlinu při virové infekci	17
1.4.3. Termoterapie	17
1.5. Metabolická odpověď rostlin vůči stresu	19
1.5.1. Teplotní stres	19
1.5.2. Biotický stres	23
1.5.3. Funkce glykosidas	25
2. Cíl práce	29
3. Materiál	30
3.1. Pomůcky	30
3.2. Chemikálie	30
3.3. Rostlinný materiál	32
4. Metody	32
4.1. Pěstování rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků	32
4.2. Příprava rostlinného extraktu	33
4.3. Imunochemická detekce metodou ELISA	33
4.3.1. Detekce obalového proteinu PVY ^{NTN}	33
4.3.2. Detekce proteinu HSP70 metodou ELISA	34
4.4. SDS elektroforéza	34
4.5. Imunochemická detekce proteinu HSP70 na nitrocelulosové membráně	35
4.5.1. Přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu metodou „Western blot“	35
4.5.2. Detekce proteinu HSP70 na nitrocelulosové membráně specifickou protilátkou	36
4.6. Stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu	36
4.6.1. Stanovení aktivity NADP-ME	37
4.6.2. Stanovení aktivity PEPC	37
4.6.3. Stanovení aktivity PPK	37
4.7. Stanovení aktivity glykosidas	37
4.8. Nativní elektroforéza	38
4.8.1. Detekce NADP-ME v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze	39

4.8.2. Detekce peroxidasy v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze.....	39
4.9. Stanovení množství proteinů Lowryho metodou	39
4.10. Stanovení hmotnosti sušiny	40
5. Výsledky.....	41
5.1. Vliv teplotního šoku na množství viru PVY ^{NTN} v rostlinách tabáku.....	41
5.2. Vliv teplotního šoku a virové infekce na množství proteinu HSP70.....	43
5.3. Obsah sušiny v rostlinách vystavených stresu	48
5.4. Vliv kombinace teplotního a biotického stresu na metabolismus rostlin tabáku.....	48
5.4.1. Vliv teplotního stresu a virové infekce na aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu.....	49
5.4.1.1. Aktivita PEPC.....	49
5.4.1.2. Aktivita NADP-ME	50
5.4.1.3. Aktivita PPK.....	53
5.4.2. Vliv kombinovaného stresu na aktivity glykosidas	54
5.4.2.1. Aktivita α -glukosidas	54
5.4.2.2. Aktivita β -glukosidas	55
5.4.2.3. Aktivita α -galaktosidas	57
5.4.2.4. Aktivita α -mannosidas	58
5.4.2.5. Aktivita β -N-acetylhexosaminidas	60
5.4.3. Statistické vyhodnocení rozdílů aktivit enzymů mezi infikovanými skupinami rostlin	61
5.4.4. Vliv kombinace teplotního šoku a biotického stresu na aktivitu a isoenzymové složení peroxidasy.....	62
6. Diskuze.....	66
7. Závěr	72
8. Literatura	73

1. Úvod

Stresové faktory působící na rostlinu vedou k rozsáhlým změnám transkriptomu, proteomu a metabolomu rostlinné buňky. Rostlina odpovídá na působení stresového faktoru složitými signálními dráhami, které jí pomáhají při obraně vůči danému stresu.

Rostliny jsou však často vystaveny působení více stresových faktorů najednou. Když stresové faktory působí na rostlinu simultánně, signální dráhy, kterými rostlina odpovídá na jednotlivé stresové faktory se mohou nebo nemusí ovlivnit. Odpověď rostlin vůči kombinaci stresů je tudíž unikátní a nemůže být přímo odvozená z odpovědí rostlin vůči působení stresových faktorů aplikovaných na rostlinu individuálně [1].

Výsledky dosavadních studií ukazují, že odpověď rostliny na kombinaci stresových faktorů je regulována řadou molekulárních mechanismů vzájemně spojených v komplexní regulační síť. Jejími klíčovými komponentami jsou transkripční faktory, kinasy, reaktivní formy kyslíku, malé RNA, kyselina abscisová, salicylová, jasmonová a také další látky [2].

1.1. Kombinace biotického a abiotického stresu

Abiotický stresový faktor působící na rostlinu infikovanou virem, bakterií nebo jiným patogenem může mít na rozvoj nemoci pozitivní i negativní účinek. Biotický stresový faktor naopak ovlivňuje odpověď rostliny na abiotický stres. Interakce biotického a abiotického stresu jsou závislé na době trvání stresů, druhu rostliny, druhu patogenu, závažnosti stresových podmínek, vývojovém stádiu rostliny a fyziologickém stavu rostliny [1].

1.1.1. Kombinace teplotního a biotického stresu

Kombinace teplotního a biotického stresu byla zkoumaná v několika studiích. Výsledkem některých experimentů bylo potlačení obranných mechanismů rostlin a zvýšení susceptibility vůči působení patogenů (bakterií, virů a hub) [1].

Teplotní stres snižoval množství superoxidového radikálu a zvyšoval aktivitu antioxidantních enzymů v rostlinách infikovaných virem [3]. Tím došlo k potlačení hypersenzitivní odpovědi rostlin a zvýšení množství rostlinných virů v rostlinách tabáku

infikovaných virem tabákové mozaiky [3], rostlinách papriky infikované virem bronzovitosti rajčete [4] a rostlinách *Arabidopsis thaliana* infikovaných virem mozaiky vodnice [5].

Zvýšená teplota ovlivnila také rozvoj bakteriální infekce v rostlinách *Arabidopsis*. Rezistence vůči biotrofní bakterii *Pseudomonas syringae* byla inhibována již mírným zvýšením teploty. Vlivem zvýšené teploty došlo k inhibici základní hypersenzitivní odpovědi a také hypersenzitivní odpovědi rostliny zprostředkované R-genem (R-proteiny rozeznávají látky produkované patogenem – elicitory). Tato inhibice korelovala s několikanásobným nárůstem množství bakterie *P. syringae* v rostlinách *Arabidopsis* [6]. Zvýšená teplota ovlivňuje také houbové choroby rostlin. Příkladem je zvýšená citlivost pšenice na přítomnost houby *Cochliobolus sativus* při zvyšujících se průměrných ročních teplotách [7].

V některých rostlinách byl pozorován opačný efekt zvýšené teploty na rozvoj nemoci. V rostlinách *Nicotiana benthamiana* infikovaných virem kroužkovitosti člunatce a vystavených teplotě 27°C byly detekovány zvýšené hladiny 21-26 nukleotidových úseků siRNA jako výsledek zvýšení obranné odpovědi rostlin – umlčení RNA (z angl. RNA silencing) [8]. Působením zvýšené teploty došlo ke snížení množství viru psorózy citrusu v pomerančovníku pravém [9] a ke zvýšení obranné odpovědi vůči nekrotrofní bakterii *Ralstonia solanacearum* v buněčné suspenzi tabáku [10].

1.1.2. Kombinace stresu ovlivňujícího vodní rovnováhu rostlin a biotického stresu

I nedostatek vody ovlivňuje rozvoj biotického stresu u rostlin. Působením sucha došlo k potlačení obranných odpovědí a zvýšení susceptibility rostlin čiroku [11] a fazole vůči houbě *Macrophomina phaseolina* [12], a datlovníku vůči nemoci způsobené houbami *Chalara radicola* a *Chalara paradoxa* [13]. Stejný fenomén byl detekován i u rostlin *Arabidopsis* infikovaných bakterii *Pseudomonas syringae* a u loubince *Parthenocissus quinquefolia* infikovaném *Xylella fastidiosa* [14, 15].

Vliv sucha na biotický stres byl zjištěn v rostlinách rajčete, kdy došlo k dvounásobnému nárůstu koncentrace kyseliny abscisové (ABA) a ke zvýšení obranné odpovědi vůči přítomnosti houby *Botrytis cinerea* a *Oidium neolycopersici* [16].

Sucho v rostlinách vyvolává i obrannou odpověď proti hmyzím herbivorům. V rostlinách rajčete vystavených stresu suchem byl sledován nárůst látek negativně ovlivňující růst herbivorů (polyfenoloxidas, rutin, kyselina chlorogenová) [17].

Biotický stres také ovlivňuje odpověď rostlin na nedostatek vody. V rostlinách řepy infikovaných virem mozaiky okurky a virem mozaiky řepy se zvýšilo množství osmoprotektantů (trehalosa, maltosa, galaktosa, melezitosa, putrescin, prolin), antioxidantů (antokyany, tokoferoly) a kyseliny askorbové. Infikované rostliny řepy měly vyšší obsah vody v porovnání s kontrolními rostlinami a vykazovaly zpožděný nástup symptomů nedostatku vody (2-5 dnů) [18].

Dalším účinkem působení biotického stresu na obranu rostlin vůči nedostatku vody bylo uzavření průduchů v listech vedoucí k redukci ztrát vody z infikovaných pletiv [19, 20].

Na druhou stranu přítomnost hlístice *Heterodera sacchari* v rostlinách rýže snižovala vodní potenciál v listech, vodivost průduchů a redukovala čerstvou hmotnost listů, čímž došlo ke zvýšení ztrát rýže spojených se suchem [21].

1.1.3. Kombinace dalších abiotických a biotických stresových faktorů

U některých dalších abiotických stresových faktorů byl zjištěn jejich účinek na zvýšení obranné odpovědi rostlin. Působením osmotického stresu na rostliny ječmene byla dosažena zvýšená odolnost rostlin vůči houbové nemoci způsobené padlím travním [22]. Zvýšená salinita napomáhala také redukci množství biotrofní houby *Oidium neolycopersici* v rostlinách rajčete [16].

Bakteriální infekce způsobená *Pseudomonas syringae* v rostlinách *Arabidopsis thaliana* byla ovlivněna ozonem. Důvodem indukované rezistence rostliny vůči bakterii bylo zřejmě zvýšení hladiny kyslíkových radikálů (peroxidu vodíku) způsobené ozonem. Peroxid vodíku pravděpodobně následně indukoval syntézu kyseliny salicylové (SA) [23]. Tento předpoklad byl potvrzen i v dalších experimentech, kde bylo zjištěno, že rostliny tabáku vystavené ozonu nebo UV záření akumulují kyselinu salicylovou a vykazují zvýšenou rezistenci vůči viru tabákové mozaiky [24].

Zvýšení obranné odpovědi rostlin bramboru a redukovaný rozvoj symptomů nemoci způsobené oomycetou *Phytophthora infestans* byl detekován zvýšením množství hlinitých iontů v půdě. V rostlinách vystavených zvýšenému množství iontů hliníku došlo k lokální akumulaci peroxidu vodíku v kořenech, systémové aktivaci SA a NO a zvýšení množství S-nitrosothiolu v listech a v hlavních žilkách listů. Vlivem těchto látek se zvýšila exprese obranných proteinů spojených s patogenezi PR-2 a PR-3. Po kontaktu rostliny stresované nadbytkem hlinitých iontů v půdě s patogenem došlo proto ke včasnému zvýšení exprese obranných genů (PR-1, PR-2, PR-3 a PAL), což vedlo k následné eliminaci patogenu v rostlině [25].

1.2. Virová infekce

1.2.1. Potyviry

Potyviry (*Potyviridae*) jsou nejvýznamnější čeledi rostlinných virů. Patří mezi ně více než 200 popsáných druhů, které představují asi 20% všech známých rostlinných virů. Čeleď potyvirů se dělí do šesti rodů lišících se hlavně druhem vektoru podílejícím se na vstupu viru do buňky.

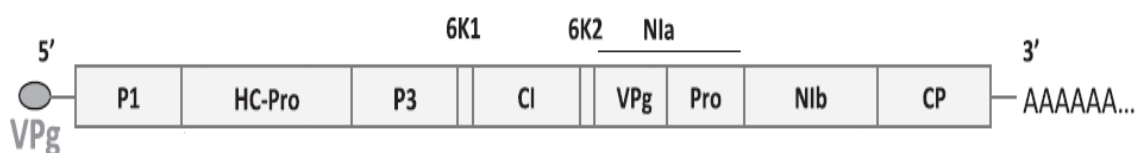
Mezi nejznámější představitele potyvirů v našich podmínkách patří A- a Y-virus bramboru, virus mozaiky cukety, virus mozaiky řepy, virus šarky švestky [26].

1.2.2. Y virus bramboru (PVY)

PVY je celosvětově rozšířený virus mající širokou škálu přírodních hostitelů, mezi které patří hlavně kultivované lilkovité druhy (paprika, brambora, tabák, rajče a některé okrasné rostliny) [27]. K infekci virem PVY dochází vegetativní propagací, mšicemi a kontaktem poškozených rostlin. Nejvíce rozšířený způsob infekce je přenos pomocí asi 40 druhů mšic, a to neperzistentním způsobem (virus se nachází krátkou dobu jen v sacím ústrojí přenášedle) [27].

Bylo popsáno pět hlavních kmenů Y viru bramboru, a to PVY^O, PVY^C, PVY^N, PVY^Z a PVY^E. Navíc, na základě struktury genomu bylo definováno několik dalších kmenů včetně PVY^{NTN}, PVY^{NA-N}, PVY^{N-Wi}, PVY^{N:O}, PVY^{NTN-NW} [28]. Symptomy infekce PVY jsou

rozdílné a závisí nejen na druhu infikované rostliny, ale také na kmeni PVY. Tabák infikovaný Y virem bramboru má na povrchu listů jemné skvrny, mozaiku nebo nekrózu, která postihuje také žilky. Při infekci dochází k zakrnutí rostliny a ke zpomalení růstu [29]. Viriony PVY tvoří ohebné, vláknité tyčinky s helikální symetrií o délce 730-740 nm a šířce 11-12 nm. Genom je tvořen jednovláknovou lineární molekulou RNA o délce 9,7 kb, která je na 5' konci kovalentně vázaná k proteinu kódovanému virem VPg (z angl. viral protein genome-linked) a na 3' konci se nachází polyadenylovaný konec [27]. Hlavní část molekuly RNA Y viru bramboru představuje oblast nazývaná jednoduchý otevřený čtecí rámec (z angl. single open reading frame), která je lemovaná oblastmi, které nejsou překládány. Tato část genomu PVY je exprimovaná do podoby jediného polyproteinu obsahujícího asi 3062 aminokyselin. Polyprotein je následně rozštěpen na 10 proteinů za pomoci 3 virových proteas: P1, HC-Pro a NIa [26, 27]. Struktura genomu viru PVY je znázorněna na obr. 1.



Obr. 1 Struktura genomu PVY. Na 5' konci RNA je kovalentně navázán protein VPg (z angl. viral protein genome-linked), dále se nacházejí geny kódující protein P1, proteasu HC-Pro (z angl. helper-component protease), protein P3, protein 6K1 (z angl. protein of 6 kDa), protein CI (z angl. cylindrical inclusion protein), protein 6K2 (z angl. second protein of 6 kDa), protein NIa (z angl. nuclear inclusion protein a), protein NIb (z angl. nuclear inclusion protein b) a obalový protein CP (z angl. coat protein). Na 3' konci RNA je polyadenylovaný konec [27].

Bylo zjištěno, že genomy virů patřících do rodu Potyvirus jsou si velmi podobné. Funkce jednotlivých proteinů viru PVY byly proto odvozeny ze znalosti funkce proteinů ostatních členů rodu Potyvirus. Většina proteinů kódovaných virem PVY má více funkcí [27].

První gen, nacházející se na 5' konci virové RNA, má označení gen pro protein P1. Protein P1 se podílí na amplifikaci genomu tím, že je schopný vázat jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou molekulu RNA [30]. Na C-konci proteinu P1 se nachází proteasová doména, která vyštěpuje P1 z polyproteinu od přilehlé proteasy HC-Pro (z angl. helper-component protease) [31]. Proteasa HC-Pro potlačuje obrannou odpověď rostliny tím, že se hromadí v buňkách a štěpením inaktivuje proteiny obranného systému rostlin, čímž se podílí na rozvoji symptomů virové infekce [26]. Protein HC-Pro se podílí také na

mezibuněčném pohybu PVY [32], na systémovém pohybu viru [33] a na přenosu virových částic mšicemi [34].

Dalším proteinem kódovaným virovou RNA je protein P3, který se účastní potyvirové genomové amplifikace a vytvoření komplexu zprostředkujícího pohyb viru [35]. Podobné funkce má i protein CI (z angl. cylindrical inclusion protein), který se podílí na intercelulárním transportu viru [36] a na replikaci virového genomu, protože má RNA-vázající, ATP-asovou a RNA-helikasovou aktivitu [37].

Protein 6K2 (z angl. second protein of 6 kDa) ukotvuje nukleoproteinový komplex viru v průběhu replikace k endoplazmatickému retikulu [38]. NIa protein (z angl. nuclear inclusion protein a) je složen ze dvou domén: proteinu VPg a proteasy Pro, která katalyzuje vyštěpení většiny funkčních virových proteinů [39]. Klíčovým krokem replikace PVY je navázání proteinu VPg na translační iniciační faktor hostitelské rostliny [40]. NIb protein (z angl. nuclear inclusion protein b) je RNA dependentní RNA polymerasa viru [41].

Obalový protein CP se účastní sbalení virionu do správné konformace, intercelulárního [32] a systémového pohybu viru [42], a hraje důležitou roli i v přenosu viru mšicemi [43].

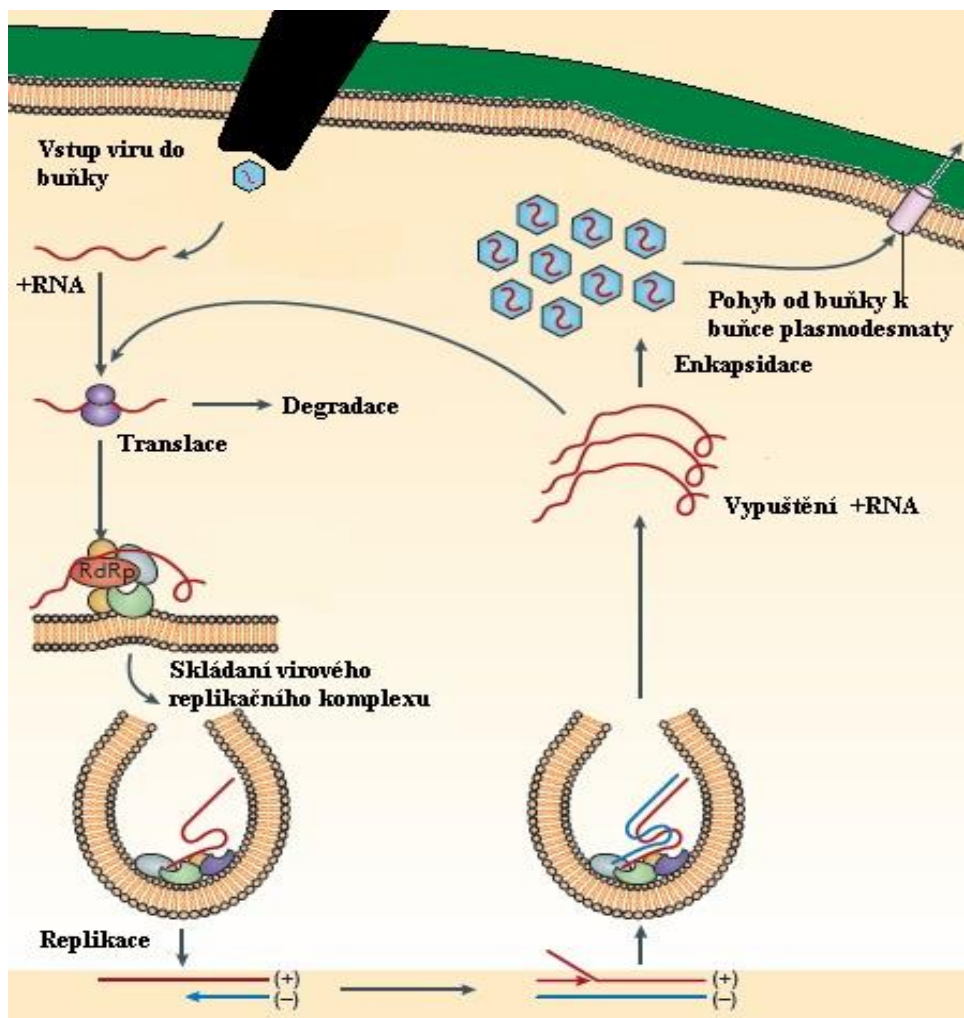
1.2.3. Vstup rostlinných virů do buňky

Na povrchu rostlinné buňky se nachází buněčná stěna, která vytváří odolnou bariéru pro většinu látek. Rostlinný virus musí tuto bariéru překonat, k tomu však nemá žádný mechanismus. Virus může vstoupit do buňky jen v místech poškození buněčné stěny. K infekci rostlinným virem dochází nejčastěji působením jiného organismu na rostlinu tzv. vektorem. Častým vektorem rostlinných virů je hmyz a k infekci dochází při sání rostlinných šťáv hmyzem.

Dalším způsobem přenosu viru je mechanické poškození povrchu rostlin. Toto poškození může být způsobené kontaktem infikované a neinfikované rostliny, nebo záměrným poškozením povrchu neinfikované rostliny karborundovým práškem a následným nanesením infikovaného extraktu (inokulace rostliny virem *in vitro*) [26].

1.2.4. Replikace a translace genetické informace rostlinných virů

Po vstupu viru do hostitelské rostliny dochází k replikaci jeho genetické informace a k vytvoření nových virových částic. Rostlinné viry pro svoji replikaci a následnou translaci využívají proteiny, intracelulární membrány, lipidy a metabolity hostitelské rostliny [44]. Po průniku (+RNA) viru do buňky je genetická informace uvolněná z obalu viru a následně dochází k její translaci. Produktem této translace jsou replikační proteiny viru, které jsou za pomoci aktinomyosinového komplexu buňky transportovány k subcelulárním membránám [44, 45]. Na povrchu membrán některých organel dochází k vytváření váčku funkcí proteinů ohýbajících části těchto membrán a enzymů katalyzujících syntézu lipidů. Replikační proteiny viru jsou ve váčcích membrán ukotveny membránovými proteiny a pomocí chaperonů a prolylisomerasy dochází k vytváření replikačních komplexů viru VRC (z angl. viral replication complex) na povrchu těchto membrán [46]. V komplexech VRC dochází k syntéze (–)RNA komplementární k originálnímu templátu (+)RNA. Molekuly (–)RNA slouží k syntéze velkého množství nových molekul (+)RNA. Molekuly (+)RNA jsou dále sbalovány a skládány do nových virových částic za účasti chaperonů hostitelské buňky [44]. Schéma životního cyklu (+)RNA virů je shrnuto v obrázku 2.



Obr. 2. Životní cyklus (+)RNA virů [44].

1.2.5. Systémová infekce

Virus se v infikované rostlině šíří z místa infekce do ostatních částí dvěma typy pohybu. Jedná se o pohyb od buňky k buňce (z angl. cell-to-cell movement) a pohyb na dlouhé vzdálenosti (z angl. long distance movement) [47].

Pohyb viru z infikované buňky (epidermální nebo mezofylové) do okolních buněk se uskutečňuje přes plasmodesmata (z angl. cell-to-cell movement). Takto se virus dostane až k buňkám cévních svazků, ze kterých prostupuje do samotných cévních svazků, kterými se šíří do ostatních částí rostliny (z angl. long distance movement) [47].

Virová částice je příliš velká aby prošla plasmodesmaty. Pohyb viru od buňky k buňce je proto zprostředkován transportními proteiny (z angl. movement proteins – MP).

Transportní proteiny se nespecifickým způsobem váží na RNA nebo DNA virové částice za vytvoření nukleoproteinového komplexu [48].

Transportní proteiny některých virů jsou kódovány virovým genomem a další viry pro svůj mezibuněčný transport využívají proteiny hostitelské buňky [26].

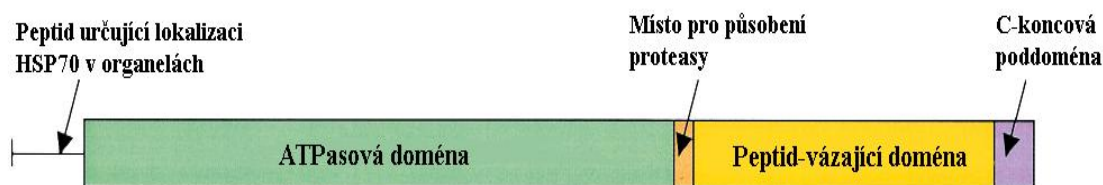
1.3. Proteiny HSP70

Rostlinné proteiny HSP70 jsou kódovány vysoce konzervovanou multigenovou rodinou. Sekvenční analýzy genů kódujících HSP70 ukazují na čtyři hlavní podskupiny lišící se lokalizací v buněčných organelách (cytosol, jádro, ER, mitochondrie, plastid) [49]. Proteiny HSP70 se nacházejí také v glyoxysomech a v proteinových tělískách [50].

1.3.1. Struktura proteinu HSP70

Protein HSP70 má dvě funkční domény. Na N-konci je to ATP-asová doména o velikosti 40 kDa, kde dochází k vazbě ATP na protein HSP70. Na N-konci se nachází také peptid odpovídající za lokalizaci proteinů HSP70 v jednotlivých organelách [49, 51].

Druhá doména na C-konci proteinu HSP70 o velikosti 25 kDa se nazývá doména vázající peptid a jak vyplývá z názvu, její funkcí je vazba peptidu-substrátu na protein HSP70. Tyto dvě domény jsou spojeny místem, kde po působení proteasy dochází k rozštěpení HSP70 na dvě části. Na úplném konci C-domény se nachází C-koncová poddoména zodpovědná za interakci HSP70 s kochaperonem [51]. Struktura genu HSP70 je zobrazena na obr. 3.

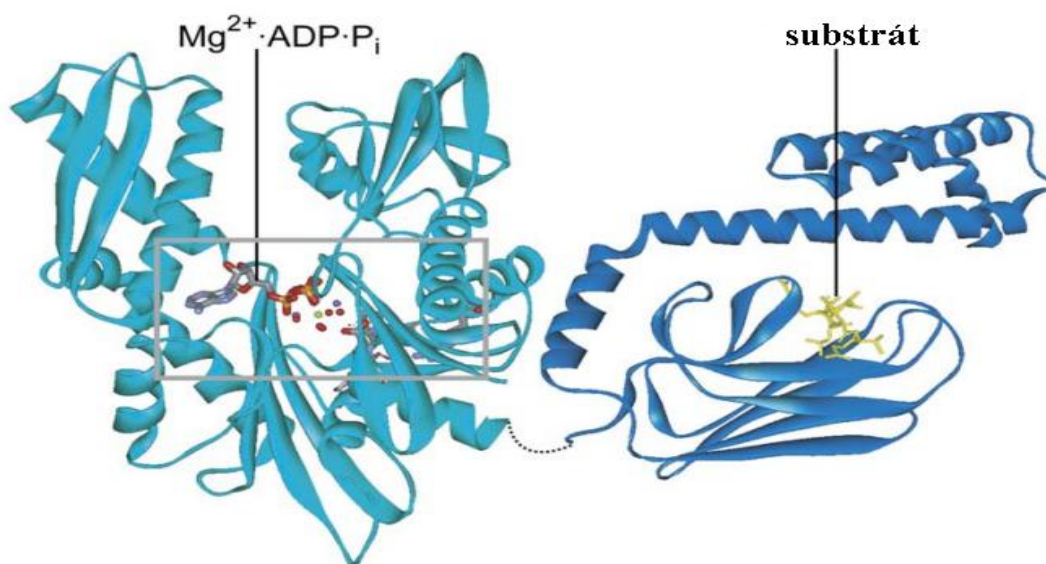


Obr. 3. Struktura genu HSP70 [51].

Trojrozměrná struktura ATP-asové domény má podobu dvou laloků, mezi kterými se nachází prohlubeň s vazebným místem pro komplex ATP, dva draselné a jeden hořečnatý

ion [52]. Podjednotky, které tvoří laloky jsou schopné pohybu, čímž může dojít k otevření a uzavření štěrby, do které se váže ATP [53].

Doména vázající peptid vytváří kavitu, do které se váže peptid-substrát. Tato kavita se uzavírá a otevírá pomocí „víčka“. K otevření víčka dochází při vazbě ATP na ATP-asovou doménu [54]. Schéma trojrozměrné struktury HSP70 je zobrazeno na obr. 4.



Obr. 4. Trojrozměrná struktura proteinu HSP70. ATP-asová doména hovězího HSC70 s navázaným komplexem ADP a Mg²⁺ a doména vázající peptid DnaK [55].

1.3.2. Funkce proteinu HSP70

Proteiny teplotního šoku o velikosti přibližně 70 kDa plní v prokaryotické i eukaryotické buňce více funkcí. Asistují při vytváření nativních konformací proteinů. Podílejí se na procesech sbalování a skládání podjednotek nově vzniklých proteinů do nativní formy. Další funkcí HSP70 je opětovné sbalování agregovaných nebo částečně denaturovaných proteinů [56].

HSP70 se účastní i transportu proteinů přes membrány organel. Aby byly proteiny přenášeny do mitochondrií, plastidů a endoplazmatického retikula schopny transportu membránovými kanály, musí být nejprve v cytosolu částečně rozbaleny pomocí proteinů HSP70. Z vnitřní strany těchto membrán jsou pak přenášeny proteiny navázány na proteiny

HSP70 umístěné v organelách a dochází k jejich opětovnému sbalení a složení do nativní konformace [57, 58].

Proteiny HSP70 lokalizované v jednotlivých organelách buňky plní další funkce. Jaderný protein NtHSP70-1 se podílí na ochraně proteinů jádra před poškozením indukovaným působením vysoké teploty, a tím brání degradaci a fragmentaci jaderné DNA [59].

Mitochondriální HSP70 také snižuje fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu vyvolané teplotním stresem. Dále se HSP70 mitochondrie podílí na zachování membránového potenciálu mitochondrie, na parciální inhibici uvolnění cytochromu c z mitochondrie do cytosolu a na snížení amplifikace ROS. Všemi těmito kroky se mitochondriální HSP70 podílí na potlačení programované buněčné smrti vyvolané teplotním šokem [60].

Protein HSP70B, uložený ve stroma chloroplastu zelených řas, plní důležitou funkci v ochraně fotosystému PSII před fotoinhibicí a také v opravě PSII v průběhu a po působení fotoinhibice. HSP70B v *Chlamydomonas* se účastní procesu obnovení funkce proteinů D1, CP43-a a vnitřního polypeptidu antény PSII [61]. Protein HSP70B se také váže na poškozený protein D1, a tím pravděpodobně brání předčasné výměně tohoto poškozeného proteinu za nový. K výměně proteinu D1 totiž dochází až po migraci poškozeného komplexu PSII z granálních lamel do oblasti membrán orientovaných do stroma chloroplastu. U rostlin je tato funkce zabezpečena fosforylací poškozeného proteinu D1 [62].

Kromě opravy fotosystému PSII protein HSP70B v *Chlamydomonas* reguluje skládání a degradaci proteinu VIPP (z angl. vesicle inducing protein in plastid 1). VIPP transportuje proteiny a lipidy do thylakoidů sinic a rostlin [63, 64].

Stromální protein HSP70 dále interaguje s enzymem ferredoxin-NADP⁺ reduktasou (EC 1.18.1.2) [65], Rieskeho FeS proteinem [66] a s fytoendesaturasou (EC 1.3.99.30) v *Narcissus pseudonarcissus* [67].

HSP70 lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu má označení BiP (z angl. binding immunoglobulin protein). BiP se podílí na správném skládání a sbalování proteinů endoplazmatického retikula a na transportu proteinů do ER. Dále se BiP účastní degradace proteinů ER procesem ERAD (z angl. ER-associated degradation). BiP indukuje proces ERAD při zvýšené akumulaci agregovaných proteinů v ER [68].

Protein BiP se účastní i několika dalších procesů v rostlinných buňkách. Například v rostlinách *Arabidopsis* je součástí procesu fúze polárních jader v průběhu rozvoje samičího gametofytu. Zralé samičí gametofyty neobsahující BiP mají dvě nespojená polární jádra, i

navzdory jejich blízkému kontaktu. Po fertilizaci BiP deficientního samičího gametofytu s divokým typem je nukleární dělení endospermu nestálé [69]. Potlačení exprese genu BiP1 v rostlinách rýže nebo naopak jeho zvýšená exprese vedou ke změnám fenotypů semen a intracelulárních struktur buněk endospermu. Dochází k redukcí zásobních proteinů v semenech, ke snížení množství škrobu a hmotnosti zrna [70].

HSP70 endoplazmatického retikula rostlin rýže ovlivňuje odpověď na biotický stres způsobený Gram negativní bakterií *Xanthomonas oryzae*. Protein BiP3 interaguje se specifickým receptorem PRR (z angl. pattern recognition receptor), čímž se v rostlinách rýže podílí na imunitě zprostředkované tímto receptorem [71].

Některé proteiny HSP70 ovlivňují růst a vývoj rostlin. V důsledku vyřazení genu kódujícího stromální HSP70 v *Arabidopsis* (cpHSc70-1) byl pozorován zvláštní fenotyp: barevné dělohy, znetvořené listy, retardace růstu a narušený růst kořenů [72]. Nedostatečná syntéza cytosolového proteinu AtHSP70-15 vedla k vážné retardaci růstu a k vadnutí listů [73].

1.4. Interakce proteinu HSP70 s virovými částicemi

Rostlinné viry, stejně jako další především abiotické stresory (např. zvýšená a snížená teplota, nedostatek nebo nadbytek vody, nepřiměřená koncentrace iontů a toxických látek, vyčerpání energie buňky a další) indukují expresi proteinů HSP70 hostitelské rostliny.

U ostatních typů stresů, zvýšená exprese HSP70 napomáhá rostlině vyrovnat se s nepříznivými vnějšími podmínkami, zachovat rovnováhu v syntéze proteinů *de novo*, opravách nebo degradaci poškozených proteinů. Zůstává otázkou, zda i v případě virové infekce mohou být proteiny HSP70 součástí obranné odpovědi, neboť jejich zvýšená exprese může současně napomáhat viru v replikačním cyklu a šíření rostlinou.

1.4.1. Interakce proteinu HSP70 s virovými částicemi během jejich replikace a transportu

Několik studií potvrdilo pozitivní vliv proteinu HSP70 na rozvoj virového onemocnění. Po umlčení genů kódujících proteiny HSP70 docházelo v infikovaných rostlinách ke snížení množství virových částic a ke zmírnění projevů infekce [73-75].

U některých rostlinných virů byla popsána jejich interakce s proteiny HSP70 hostitelské rostliny. Většinou se jedná o proteiny replikačního aparátu virů nebo obalové proteiny virů.

Například bylo zjištěno, že rostlinný protein HSP70 interaguje s replikačními proteiny viru keříčkovitosti rajčete (TBSV). Předpokládá se, že tímto krokem se HSP70 podílí na ochraně hydrofobních transmembránových domén replikačních proteinů před agregací. HSP70 je také zapojen do řízení subcelulární lokalizace replikačních proteinů, tím že napomáhá jejich připojení na intracelulární membrány ER a peroxisomů. Tento krok se zdá být kritický pro skládání celého replikačního komplexu viru. HSP70 zůstává navázán na replikační proteiny viru i po jejich spojení s membránami a pravděpodobně může plnit další funkce při samotné replikaci viru TBSV [76].

Proteiny HSP70 a HSP90 interagují s proteinem p27 - komponentou replikačního komplexu viru nekrotické mozaiky jetele lučního (RCNMV). K této interakci dochází na membráně ER rostlinné buňky a při inhibici daného kroku nedochází k vytvoření správného replikačního komplexu viru, zároveň ale dochází k vytváření a akumulaci velkých komplexů, neschopných replikace RNA viru [75].

Protein HSC70-3 v *Arabidopsis* interaguje v *in vitro* podmínkách s RNA-dependentní RNA polymerasou viru mozaiky vodnice. K interakci dochází pravděpodobně v replikačních komplexech vytvořených z membrán buňky [77].

Plastidový protein cpHSC70-1 interaguje s transportním proteinem viru mozaiky javoru (AbMV). Tato interakce je důležitá pro transport viru a indukci symptomů virové infekce [78].

Protein HSP70 je součástí ribonukleoproteinového komplexu A viru bramboru (PVA). HSP70 také interaguje s exogenním obalovým proteinem (CP) tohoto viru za pomoci kochaperonu CIP. Vytvoření komplexu HSP70 s CP vede k následné modifikaci obalového proteinu, a to konkrétně k jeho ubikvitinaci a degradaci. Obalové proteiny některých (+)RNA virů při dosažení určité koncentrace v buňce potlačují expresi virových proteinů a inhibují další replikaci virů. HSP70 se degradaci CP viru PVA zřejmě nepřímo podílí na zvýšení množství viru v rostlinách [79].

HSP70 v rajčatech infikovaných virem žluté kadeřavosti listů rajčete (TYLCV) vytváří nerozpustné agregáty s obalovým proteinem viru. Tyto agregáty byly nalezeny v cytoplazmě a později v jádře a ve vaskulárním systému rostliny. HSP70 je pravděpodobně důležitý pro transport tohoto viru rostlinou [74]. Také byla pozorována interakce obalového proteinu viru mozaiky pepina (PepMV) s rostlinným proteinem HSC70-3 [80].

V tabulce níže jsou uvedeny příklady virů, u kterých byla zjištěna interakce s proteinem HSP70.

Tab 1. Příklady rostlinných virů interagujících s proteinem HSP70

Virus	Rostlina	Reference
Virus keříčkovitosti rajčete (TBSV) Tomato bushy stunt tombusvirus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Wang et al., 2009 [76]
Virus mozaiky javoru (AbMV) Abutilon mosaic virus	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Krenz et al., 2010 [78]
Virus mozaiky vodnice (TuMV) Turnip mosaic virus	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Jungkunz et al., (2011) [73]
Y virus bramboru (PVY) Potato virus Y	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hofius et al., 2007 [81]
Virus nekrotické mozaiky jetele lučního (RCNMV) Red clover necrotic mosaic virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Mine et al., 2012 [75]
Virus mozaiky vodnice (TuMV) Turnip mosaic virus	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dufrense et al., 2008 [77]
A virus bramboru (PVA) Potato virus A	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Hafren et al., 2010 [79]
Virus mozaiky pepina (PepMV) Pepino mosaic virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Mathioudakis et al., 2012 [80]
Virus žluté kadeřavosti listů rajčete (TYLCV) Tomato yellow leaf curl virus	<i>Solanum lycopersicum</i>	Gorovits et al., (2013) [74]
Virus tabákové mozaiky (TMV) Tobacco mosaic virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Chen et al., 2008 [82]
X virus bramboru (PVX) Potato virus X		
Virus mozaiky melounu (WMV) Watermelon mosaic virus		
Virus mozaiky okurky (CMV) Cucumber mosaic virus		

Viry ze skupiny Closteroviridae jsou jediné rostlinné viry kódující protein HSP70h, který je homologem rostlinných proteinů HSP70 [83]. Vlákňité viriony closterovirů mají dlouhé tělo obalené majoritním obalovým proteinem CP a krátkým ocasem tvořeným minoritním obalovým proteinem CPm. Genetické a biochemické analýzy ukazují, že funkce těchto komponent virionů jsou různé. Tělo virionu chrání genom viru, přičemž ocas vytváří speciální zařízení pro intercelulární pohyb. Integrální částí virionu je homolog HSP70, který skládá ocas virionu. Inaktivace ATP-asové domény HSP70h způsobuje vznik bezocasého virionu neschopného translokace [84].

1.4.2. Pozitivní účinek proteinu HSP70 na rostlinu při virové infekci

Zvýšená syntéza proteinů HSP70 je spojována i s obrannou odpovědí rostlin na přítomnost viru [85, 86].

Po infikování odrůd rajčete virem žluté kadeřavosti listů rajčete (TYLCV), byl pozorován pokles hladiny proteinů HSP70 u odrůd vnímavých k viru TYLCV, přičemž u rostlin rezistentních k TYLCV se množství HSP70 nezmenšovalo. Tento pokles přítomnosti HSP70 u vnímavých rostlin byl doprovázen i celkovým poklesem množství proteinů a zvýšeným rozvojem symptomů nemoci [86].

Dále bylo zjištěno, že proteiny HSP70 se podílejí na rozvoji hypersenzitivní reakce (HR) rostlin, neboť u rostlin s umlčenými geny pro HSP70 nebyla po aplikaci elicitoru HR pozorována [85].

1.4.3. Termoterapie

Snížit množství viru nebo úplně ozdravit infikované rostliny je možné aplikací zvýšené teploty - termoterapie [87-95]. U některých virů je tohoto výsledku dosaženo kombinací termoterapie a kryoterapie (zmražení v tekutém dusíku) [87] nebo kombinací termoterapie a chemoterapie [88].

Termoterapie se provádí v *in vitro* podmínkách. Z infikované rostliny se odebere kousek, který je přenesen do kultivačních nádob obsahujících příslušné médium. Pro termoterapie z důvodu ozdravení infikované rostliny se u některých rostlin odebírají kousky apikálních

meristémů a mladé výhonky protože tyto kousky rostlin obsahují nízké nebo žádné koncentrace viru [96].

Při termoterapii dochází postupně ke zvyšování teploty až do dosažení požadovaného maxima. Zvýšená teplota se na rostliny aplikuje až několik týdnů [87-95].

V tabulce níže jsou uvedeny příklady rostlin, u kterých došlo ke snížení množství virů nebo k ozdravení rostlin po působení zvýšené teploty.

Tab. 2. Příklady virů a rostlin po úspěšné aplikaci termoterapie

Virus	Rostlina	Reference
Virus keříčkovité zakrslosti maliníku (RBDV) Raspberry bushy dwarf virus	<i>Rubus idaeus</i>	Wang et al., 2008 [95]
Virus svinutky révy vinné Pr (GLRaV-Pr) Grapevine leafroll-associated virus Pr	<i>Vitis vinifera</i> L.	Maliogka et al., 2009 [89]
Virus spojovaný s mělkou vrásčitostí kmene révy vinné (GRSPaV) Grapevine rupestris stem pitting associated virus		
Virus chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV) Apple chlorotic leaf spot virus	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Fengshui	Tan et al., 2010 [94]
Virus žlábkovitosti kmene jabloně (ASGV) Apple stem grooving virus		
Virus mělké vrásčitosti kmene jabloně (ASPV) Apple stem pitting virus		
Virus révy vinné (GVA) Grapevine vitivirus A	<i>Vitis vinifera</i>	AlMaarri et al., 2012 [87]
Bezpríznaková viróza lilie (LSV) Lily symptomless virus	<i>Lilium x elegans</i> Thunb	Nesi et al., 2009 [91]
Virus bronzovitosti rajčete (TSWV) Tomato spotted wilt tospovirus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Roggero et al., 1997 [93]
Virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) Onion yellow dwarf virus	<i>Allium sativum</i> L.	Robert et al., 1998 [92]
Virus šarky švestky (PPV) Plum pox virus	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i> Max	Manganaris et al., 2003 [90]
Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV) Prunus necrotic ringspot virus		
Virus chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV) Apple chlorotic leaf spot virus	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Hu et al., 2012 [88]
Virus žlábkovitosti kmene jabloně (ASGV) Apple stem grooving virus		

1.5. Metabolická odpověď rostlin vůči stresu

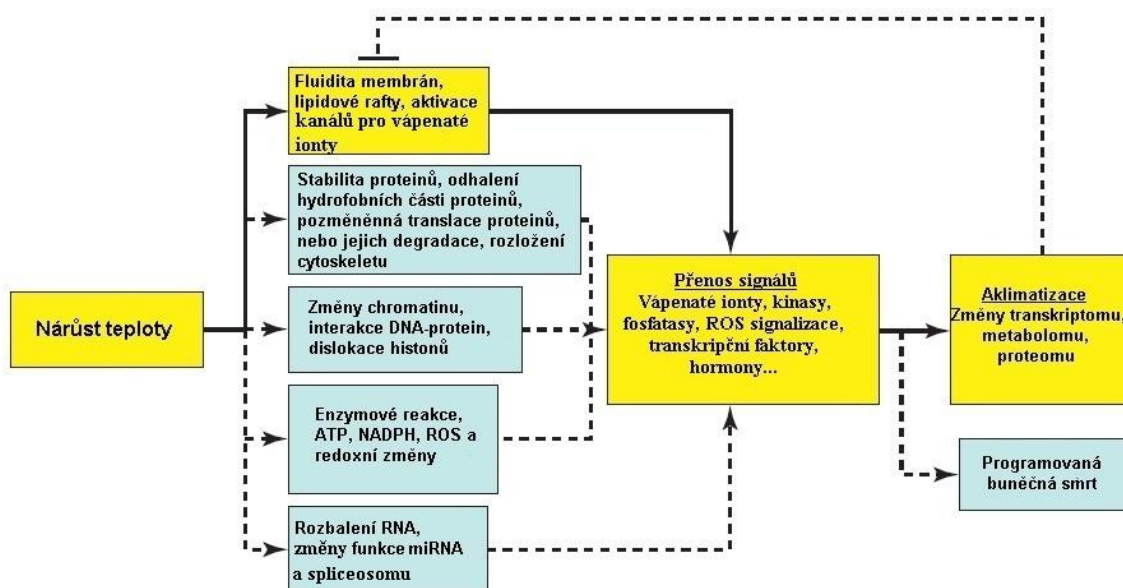
1.5.1. Teplotní stres

Když je rostlina vystavená působení zvýšené teploty skoro všechny makromolekuly rostlinné buňky (proteinové komplexy, membrány, polymery nukleových kyselin) vnímají tuto zvýšenou teplotu simultánně. Zvýšená kinetická energie makromolekul působí fyzikální změny: zvýšení membránové fluidity, částečnou denaturaci DNA a RNA řetězců, oddělení proteinových podjednotek a následné vystavení hydrofobních částí těchto proteinů, což vede k jejich agregaci. Všechny makromolekuly mohou proto sloužit jako termosenzory pomocí změny své funkce nebo její přechodnou ztrátou [97].

V důsledku teplotního stresu dochází ke změně membránové fluidity, k otevření iontových kanálů a toku vápenatých iontů z apoplastu do cytoplasmy. Jedná se však pouze o krátkodobé otevření, v průběhu několika sekund se kanály pro vápenaté ionty uzavírají [98]. Vápenaté ionty se vážou na kalmodulin [99] a tento komplex dále aktivuje kinasy a transkripční regulátory odpovědi na teplotní stres, jako jsou například HSF, MBF1c, WRKY [100] a DREB [101].

Zvýšené hladiny cytosolových Ca^{2+} iontů také aktivují enzym produkující ROS - RBOHD (z angl. respiratory burst oxidase homolog D, jinak nazývaný NADPH oxidasa RBOHD) lokalizovaný na plazmatické membráně. ROS vytvořené pomocí RBOHD mohou působit depolarizaci membrán, nebo mohou spouštět signální cesty přes transkripční faktory (MBF1c, přímo HSF, MAPK a/nebo SnRK) [102, 103].

Proti oxidativnímu stresu se buňka brání akumulací antioxidantů např. thioredoxinu H [104], a zvýšením aktivity antioxidantů enzymů peroxidasy (EC 1.11.1.7) [105], superoxiddismutasy (EC 1.15.1.1), katalasy (EC 1.11.1.6) a askorbátperoxidasy (EC 1.11.1.11) [106].



Obr. 5. Schematický model pro teplotní senzitivitu rostlin [97].

Fotosyntéza je buněčný proces nejvíce ovlivněný teplem. Fotosyntéza C3 rostlin je v porovnání s C4 rostlinami více ovlivněna. Teplotní stres nejvíce poškozuje komplex vyvíjející kyslík ve fotosystému PSII. Celková aktivita fotosystému PSII je redukována nebo úplně inhibována [107]. Teplotní šok inhibuje aktivitu enzymu aktivasy RubisCO, čímž dochází ke snížení fixace uhlíku enzymem RubisCO [108]. Působením vysoké teploty dochází také ke zvýšení oxygenasové aktivity enzymu RubisCO na úkor karboxylasové aktivity tohoto enzymu, čímž se zvyšuje fotorespirace rostlin [109]. Vlivem zvýšené teploty dochází k redukcí množství fotosyntetických pigmentů [110]. Dále je významně ovlivněna vodní bilance rostliny, vodivost průduchů v listech a intercelulární koncentrace CO₂ [111]. Působením vysoké teploty dochází k zásadním změnám ve strukturální organizaci thylakoidů, k nesprávnému skládání gran thylakoidů a jejich praskání [107].

Vysoká teplota zvyšuje množství plastidového elongačního faktoru EF-Tu [112], pravděpodobně z důvodu ochrany stromálních proteinů před agregací způsobenou teplem [113]. Transgenní pšenice exprimující kukuřičný gen kódující plastidový EF-Tu vykazovala sníženou agregaci proteinů v listech způsobenou zvýšenou teplotou, snížené poškození fotosyntetických membrán a zvýšenou fixaci CO₂. Toto ukazuje na potenciální chaperonovou funkci elongačního faktoru EF-Tu [114].

Teplotní stres zasahuje i do metabolismu sacharidů, zvyšuje syntézu β -amylasy (EC 3.2.1.2) a snižuje aktivitu ADP-glukosapyrofosforylasy (E.C. 2.7.7.27). Výsledkem je

zvýšená degradace škrobu a jeho snížena syntéza [115]. Koordinované indukování a potlačení funkce specifických metabolických cest zvyšuje možnost přežití buňky v nepříznivých podmínkách tím, že dochází ke zvýšení energetické kapacity v podobě jednoduchých cukrů.

Po působení teplotního stresu dochází ke zvýšení aktivity a funkce enzymů, které jsou součástí metabolismu sacharidů, cyklu trikarboxylových kyselin a pentosafosfátové cesty (UDP-glukosa pyrofosforylasa EC 2.7.7.9, pyruvátdehydrogenasa EC 1.2.4.1 a transketolasa EC 2.2.1.1). Zvýšením teploty byla zjištěna také zvýšená aktivita enzymu glycinderhydrogenasy (EC 1.4.1.10), který se podílí na udržování elektronového toku a v prevenci fotoinhibice při stresových podmínkách [104].

V rostlinách *Arabidopsis* vystavených teplotnímu šoku docházelo také k akumulaci několika aminokyselin odvozených od pyruvátu a oxalacetátu, dále fumarátu a malátu, některých metabolitů obsahujících aminoskupinu jako β -alanin, γ -aminobutyrová kyselina (GABA), putrescin a sacharidů, především sacharosy, rafinosy, maltosy, galaktikolu a myoinositolu [116].

Tyto nízkomolekulární organické molekuly (aminokyseliny, kvartérní aminy, polyoly/cukry) akumulující se při působení stresových podmínek se nazývají kompatibilní rozpuštěné látky a jejich primární funkcí je udržování buněčného turgoru a vychytávání volných radikálů [117].

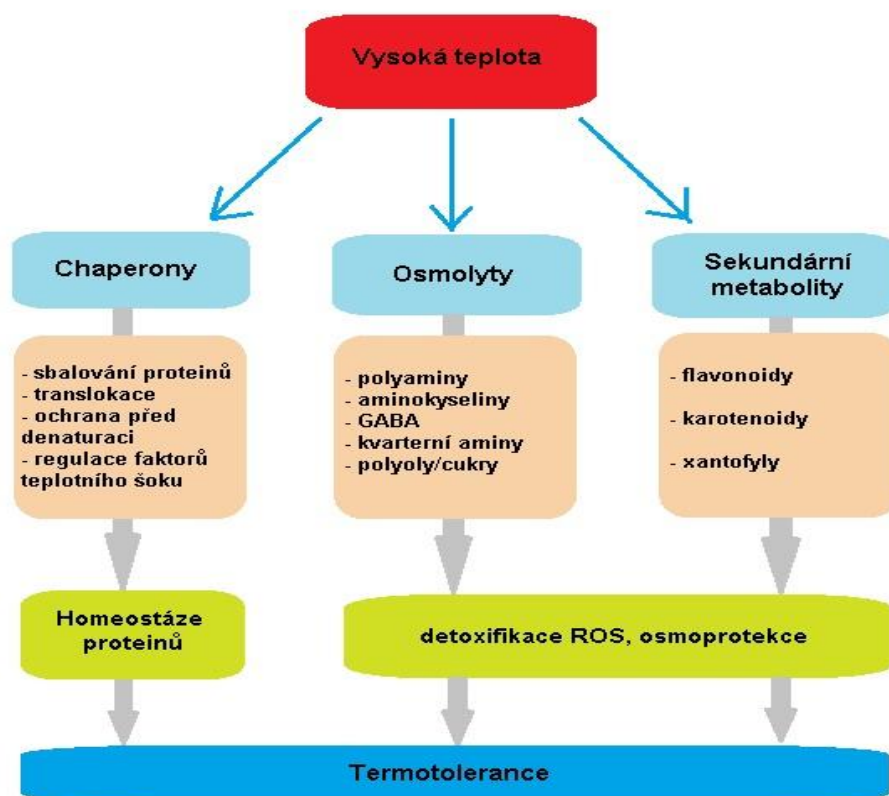
Ve stresových podmínkách je známá protektivní funkce prolinu, jehož množství je po působení HS pro různé typy rostlin specifické. Významná akumulace prolinu po působení HS byla zaznamenána v listech rajčete [118], tabáku [119] a mírné zvýšení bylo pozorováno v cizrně [120], ječmeni a ředkvi [121]. Na druhou stranu k akumulaci prolinu nedošlo v *Arabidopsis* [2] a dokonce snížení bylo pozorováno v klíčících semenech pšenice [122].

Odpověď na teplotní stres a tolerance vůči teplotnímu stresu jsou spojeny s produkcí sekundárních metabolitů jako jsou fenolické látky, včetně flavonoidů a fenylypropanoidů. Vlivem teplotního stresu byla také zaznamenána i zvýšená aktivita fenylyalaninamoniumlyasy (EC 4.3.1.5), klíčového enzymu fenylypropanoidní dráhy. Výsledkem je zvýšená aklimatizace buněk k teplotnímu stresu [123].

Vlivem teplotního stresu je regulace asi 5% rostlinného transkriptomu (přibližně 1500 genů) dvakrát nebo vícekrát zvýšená [2, 124]. Velkou část těchto transkriptů tvoří právě proteiny teplotního šoku HSP: 88 z 1780 v *A. thaliana*, 117 z 1509 v pšenici [2, 125].

Odhalení hydrofobních částí proteinů indukované teplem vede k nahromadění agregovaných a denaturovaných proteinů v buňce. Následně dochází v cytosolu a ER k odpovědi na nesbalené proteiny - UPR (z angl. unfolded protein response), která zvyšuje množství transkriptů chaperonů v těchto částech buňky [97].

Změna membránové fluidity také vede ke zvýšené expresi malých HSP, které se stávají součástí poškozených membrán a pomáhají v opravě struktury membrán [126, 127].



Obr. 6. Molekulární chaperony a metabolity účastní se odpovědi na teplotní stres a termotoleranci [128].

Odpověď rostliny na zvýšenou teplotu je závislá na době trvání stresu, závažnosti stresu a druhu rostliny. Při extrémně zvýšené teplotě dochází v průběhu několika minut k poškození buňky nebo až k buněčné smrti. Teplotní stres ovlivňuje širokou škálu rostlinných procesů jako klíčení, růst, vývin a reprodukce [107].

Výsledkem teplotního šoku je zvýšená sterilita. Dochází k narušení meiosis v samčích a samičích orgánech, narušení klíčení semen a růstu sazenic, snížení životaschopnosti vajíčka, redukování procenta semen a poškození fertilizačních procesů [129].

Vlivem vysoké teploty se mění morfologie rostliny. Teplotní šok působí ztrátu vody, a tím se redukuje velikost buněk a následně i celé rostliny. Další morfologické symptomy

delšího působení vysoké teploty jsou spálení listů a větviček, větví a stonků, vadnutí listů a jejich následné opadávání, inhibice růstů výhonků a kořenů, ztráta barvy plodů a jejich poškození [107].

1.5.2. Biotický stres

Biotický stres způsobený virovou infekcí má velký vliv na metabolismus rostlin. Nejzávažnějším důsledkem virové infekce je zpomalení fotosyntézy. Dochází k uzavření průduchů rostlin, snižuje se množství xantofylů, karotenoidů, chlorofylů a a b. Na snížení rychlosti fotosyntézy se dále podílí snížená aktivita enzymů a komplexů, které jsou součástí této metabolické dráhy. Byla pozorována snížená aktivita RubisCO a dramatický pokles aktivity celého elektrontransportního řetězce fotosystému PS II [130-132].

Přítomnost viru v rostlinách ovlivňuje také metabolismus sacharidů. V první fázi akutní infekční periody (rychlá reprodukce viru a šíření v rostlině) dochází u rostlin k poklesu aktivity enzymů katalyzujících odbourávání polysacharidů a ke zvýšení aktivity enzymů syntetizujících polysacharidy [133]. Rostlinné buňky akumulují škrob a snižuje se hladina sacharosy [134].

V druhé fázi virové infekce je naopak zvýšená aktivita enzymů odbourávajících polysacharidy a snížená aktivita enzymů syntetizujících polysacharidy [133]. Pokles množství škrobu koreluje se sníženou aktivitou enzymu podílejícího se na syntéze škrobu (ADP-glukosapyrofosforilasa EC 2.7.7.27) a s nárůstem aktivity enzymu degradujícího škrob (fosforilasa škrobu EC 2.4.1.1) [134]. Virová infekce zvyšovala množství sacharosy i ve floémové tekutině řapíků rostlin melounu. Množství sacharosy bylo dokonce větší než množství stachyosy, která je nejvíce zastoupenou látkou ve floémové tekutině rostlin melounu [135]. V pozdější fázi infekce se zvyšuje respirace rostlin [134].

Virová infekce má také velký stimulační efekt na oxidativní pentosafosfátovou cestu (glukosa-6-fosfátdehydrogenasa EC 1.1.1.49, 6-fosfo-glukonátdehydrogenasa EC 1.1.1.44), glykolýzu (ATP- a pyrofosfát-dependentní fosfofruktokinasa EC 2.7.1.11, EC 2.7.1.90), cyklus trikarboxylových kyselin (isocitrátdehydrogenasa EC 1.1.1.41, fumaráthydratasa EC 4.2.1.2) a oxidativní transport elektronů (cytochrom c oxidasa EC 1.9.3.1) [134].

Po nástupu symptomů virové infekce dochází k akumulaci peroxidu vodíku a k následné lipidové peroxidaci a degradaci chlorofylu [136].

Virová infekce ovlivňuje také aktivity některých enzymů s anaplerotickými funkcemi. V rostlinách *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 bylo detekováno zvýšení aktivit enzymů Hatchova-Slackova cyklu, a to NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME EC 1.1.1.40) [137], fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC EC 4.1.1.31) [138] a pyruvát, fosfát dikinasy (PPDK EC 2.7.9.1) [139]. Z tohoto důvodu byly v této práci využity jako markery metabolické odpovědi na biotický stres.

Zvýšená aktivita enzymu PEPC vlivem virové infekce je pravděpodobně výsledkem fosforylace PEPC než syntézy *de novo* [138]. Vzhledem k tomu, že vlivem infekce je snížena aktivita enzymu RubisCO a jsou uzavřeny průduchy, může být nedostatek CO₂ pro RubisCO kompenzován fixací HCO₃⁻ pomocí PEPC a následným uvolněním CO₂ pomocí NADP-ME [138, 140].

Metabolismus infikovaných rostlin je ovlivněn také rozvojem obranných mechanismů. Obranná strategie rostlin vůči působení biotických stresových podmínek je rozsáhlá. Mezi hlavní mechanismy patří mechanismus umlčování genů tzv. RNA silencing [141], produkce reaktivních forem kyslíku [142] a hypersenzitivní reakce [143].

Mechanismus umlčování RNA je obranná odpověď rostliny proti viru zahrnující štěpení virové RNA na malé virové dvouřetězcové úseky RNA enzymem DICER z virové RNA. Vyštěpené dvouřetězcové úseky RNA jsou poté schopny inhibovat expresi odpovídajících jednořetězcových mRNA virů [144, 145].

Další obranná reakce rostliny vůči působení biotického stresu je hypersenzitivní reakce rostliny. Tato reakce vede k nekróze buněk v jejichž okolí došlo k průniku patogenu do rostliny [143]. Dalším znakem hypersenzitivní reakce je indukce genů kódujících obranné proteiny rostliny. Patří sem strukturní proteiny extracelulární matrix podílející se na odstranění patogenu, enzymy sekundárního metabolismu katalyzující syntézu látek s antimikrobiálním účinkem a dalších obranných látek proti patogenům, a nakonec jsou to proteiny spojené s patogenezí tzv. pathogenesis related proteins (PR) [146].

PR proteiny pomáhají rostlině jednak bojovat se stresem a také se na působení stresových podmínek adaptovat [147]. PR proteiny mají charakteristické biochemické vlastnosti. Jsou to nízkomolekulární proteiny (6-43 kDa), které jsou stabilní a extrahovatelné při nízkém pH (menší než 3), odolné vůči působení zvýšené teploty a proteas [148]. PR proteiny jsou lokalizovány ve vakuole, v buněčné stěně a v extracelulárním prostoru [146, 148].

Proteiny spojené s patogenezí se dělí do několika skupin. Molekulárními a molekulárně genetickými technikami bylo například v tabáku nalezeno a charakterizováno pět hlavních skupin těchto proteinů: skupiny PR-1 až PR-5 [149].

1.5.3. Funkce glykosidas

Glykosidasy katalyzují hydrolýzu glykosidových vazeb v glykosidech, proteoglykanech a dalších glykokonjugátech. Glykosidasy se dělí na exo- a endoglykosidasy podle toho, zda štěpí glykosidovou vazbu uprostřed nebo na konci řetězce (nejčastěji na neredukujícím konci řetězce) [150]. Glykosidasy mají všeobecně vysokou specifitu vůči glykosylové skupině a nižší specifitu vůči aglykonu, který odštěpují. Glykosidasy hydrolyzují většinu hlavních glykosidových vazeb v buněčných polysacharidech. Podílejí se tím na opravě buněčné stěny, na expanzi, diferenciaci a maturaci rostlinné buňky [151]. Při vhodných podmínkách jsou některé glykosidasy schopny katalyzovat i syntézu glykosidů [150].

α -glukosidasa (EC 3.2.1.20)

α -glukosidasy jsou velmi rozšířenou a rozmanitou skupinou enzymů, které vykonávají různé funkce závislé na subcelulární lokalizaci α -glukosidas a na organismu, ve kterém se nacházejí. Jsou to exo-glykosidasy, katalyzující uvolnění α -D-glukosy z neredukujícího konce substrátů [152].

Různé formy těchto enzymů hydrolyzují odštěpení α -1,1-, α -1,2-, α -1,3-, α -1,4- a α -1,6- vázané glukosy z glykoproteinů, nebo neredukujících konců disacharidů a škrobu. Také katalyzují α -D-glukosyl transferasové reakce [153, 154].

α -glukosidasy byly purifikovány z rostlin, mikroorganismů a živočichů. Tyto enzymy byly rozděleny do třech skupin. Typ I hydrolyzuje heterogenní substráty, jako aryl glykosidy a také sacharosu více efektivně než maltosu. Typ II preferuje maltosu a isomaltosu a má nízkou afinitu k aryl glykosidům. Typ III má stejnou specifitu jako II a kromě toho katalyzuje hydrolýzu polysacharidů amylosy a amylopektinu [152].

Chloroplastová α -glukosidasa hrachu se pravděpodobně podílí na degradaci škrobu [155, 156]. Dvě rozdílné formy α -glukosidas v ER katalyzují odštěpení α -1,2- a α -1,3- vázaných glukos z nascentních glykoproteinů. Tento proces je součástí sbalování glykoproteinů [157].

V rostlinách byla zjištěná i přítomnost apoplastické formy α -glukosidasy avšak její funkce zůstává nejasná z důvodu malého množství enzymových substrátů přítomných v apoplastu [155, 158].

Funkce α -glukosidasy v semenech ječmene byla zkoumána aplikací inhibitorů α -glukosidasy a vytvořením transgenní rostliny mající o padesát procent nižší aktivitu enzymu. Tímto způsobem bylo zjištěno, že α -glukosidasa štěpí maltosu na glukosu, podílí se na degradaci škrobu, a tím i na růstu semen ječmene [159].

β -glukosidasa EC 3.2.1.21

β -glukosidasy jsou velmi rozšířeny v celé rostlinné říši. Hydrolyzují β -D-glukosidové vazby a produkují neredukující β -D-glukosové zbytky a koncové aglykony [160]. β -glukosidasy se podílejí na obraně rostlin, lignifikaci buněčné stěny, hydrolýze β -D-glukanu buněčné stěny, aktivaci fytohormonů a uvolňování aromatických látek rostlin [161]. β -glukosidasa je zřejmě zapojená do odbourávání antokyaninů v průběhu poslední fáze zrání ovoce [162].

Lokalizace β -glukosidasy byla zkoumaná v plodech sladké třešně. U nezralého plodu byla β -glukosidasa lokalizována v cytosolu a apoplastu, ve zralém plodu byla detekována asociace β -glukosidasy s buněčnou stěnou [163].

Fotosyntetická aktivita ve spojení s aktivitou β -glukosidasy byla zkoumána v různých stádiích senescence rostlin. Ztráta fotosyntetické aktivity v průběhu senescence je doprovázena signifikantním nárůstem aktivity β -glukosidasy vázané k buněčné membráně, která štěpí polysacharidy na rozpustné cukry. Tím se předpokládá, že polysacharidy vázané k buněčné stěně jsou zdrojem sacharidů pro rostlinu v senescenci [164].

α -galaktosidasa EC 3.2.1.22

α -galaktosidasy katalyzují hydrolýzu α -1,6-vázaných galaktosylových zbytků ze široké škály lineárních a rozvětvených oligosacharidů, polysacharidů a také syntetických substrátů jako p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid [165, 166].

α -galaktosidasa je jedním ze tří enzymů účastnících se modifikace a degradace galaktomannanů buněčné stěny. Bylo pozorováno, že aktivita α -galaktosidasy narůstala

postupně v průběhu vývoje endospermu kávového zrna a dosáhla maxima asi po 30 dnech od vytvoření květu, což je spojeno s tvrdnutím zrna [167].

Aktivita α -galaktosidasy byla zkoumána i v plodech papáje. Nízká aktivita byla detekována ve fázi rozvoje plodů a k jejímu zvýšení došlo v průběhu zrání plodů. α -galaktosidasa v plodech papáje také zvyšovala rozpustnost pektinu a jeho depolymerizaci v průběhu zrání plodů. Z tohoto důvodu se α -galaktosidasa zřejmě podílí na měknutí zrajícího plodu [168].

Chloroplastová α -galaktosidasa v rostlinách rýže se podílí na degradaci thylakoidní membrány v průběhu senescence rostliny. Degraduje digalaktosyl diacylglycerol (glykolipid) thylakoidní membrány [169].

α -mannosidasa EC 3.2.1.24

α -mannosidasy hydrolyzují koncovou α -mannosidasovou vazbu v mannose a komplexním typu N-vázaných oligosacharidů přítomných v glykoproteinech. Podle sekvenční homologie a inhibice jsou rozděleny do dvou skupin. α -mannosidasy skupiny I se podílejí na zpracování N-vázaných oligosacharidů. Tyto α -mannosidasy jsou lokalizovány v ER a Golgiho aparátu [170].

Skupina II α -mannosidas obsahuje tři subkategorie enzymů, lokalizovaných v Golgiho aparátu, v cytosolu a v lysozomech nebo vakuole. α -mannosidasa v Golgiho aparátu se podílí na zpracování N-vázaných oligosacharidů se specificitou pro α -1,3- a α -1,6 vázanou mannosu [170]. Dále se tato skupina účastní přeměny a degradace cytosolových a vakuolárních N-vázaných oligosacharidů a proteinového obsahu vakuol [155].

Aktivita α -mannosidasy se zvyšuje v průběhu klíčení semen a zrání plodů [171].

β -N-acetylhexosaminidasa EC 3.2.1.52

β -N-acetylhexosaminidasa hydrolyzuje N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) a N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc) z neredukujících konců přirozeně se vyskytujících sacharidů, nebo uměle připravených substrátů (např. substrátů značených p-nitrofenolem).

V rostlinách byly vysoké hladiny β -N-acetylhexosaminidasy detekovány při klíčení semen [172] a při měknutí plodů v průběhu jejich zrání [173, 174]. Také je předpokládána funkce

β -N-acetylhexosaminidasy v procesech spojených s obranou rostliny, protože několik β -N-acetylhexosaminidas může degradovat oligomery chitinu [172, 175].

V *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány tři geny kódující β -N-acetylhexosaminidasu HEXO1, HEXO2 a HEXO3. β -N-acetylhexosaminidasa kódovaná genem HEXO1 je lokalizována ve vakuole a podílí se na štěpení vakuolárních N-glykanů. Enzymy kódované geny HEXO2 a HEXO3 jsou součástí plazmatické membrány a zpracovávají N-glykany, které jsou součástí glykoproteinů určených pro sekreci [176].

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda teplotní šok (2 hod. 42°C) aplikovaný před nebo po inokulaci rostlin tabáku Y virem bramboru (PVY^{NTN}) ovlivňuje rozvoj virové infekce v porovnání s rostlinami infikovanými bez teplotního šoku. V experimentálních rostlinách byly sledovány změny v metabolismu způsobené virovou infekcí, teplotním šokem a kombinací obou zmíněných stresorů. Za tímto účelem bylo provedeno:

- ◆ stanovení množství obalového proteinu PVY^{NTN}
- ◆ stanovení množství proteinu HSP70
- ◆ stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu
- ◆ stanovení aktivity vybraných glykosidas
- ◆ stanovení aktivity a isoenzymového složení rozpustných peroxidas

3. Materiál

3.1. Pomůcky

Analytické váhy 100 A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Universal 32 R – Hettich Zentrifugen, Německo

Čtečka mikrotitračních destiček - Sunrise, TECAN, Švýcarsko

Elektroforetická souprava - Biometra, Německo

Mísíč gradientu – Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

pH/mV metr UB-10 – Denver Instrument Company, USA

Souprava pro přenos proteinů - Biometra, Německo

Spektrofotometr Helios α – Thermo Spectronic, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 Pro – Biochrom, Velká Británie

Termostat se suchou lázní EL-01 – Major Science, USA

Vortex – Biosan, Lotyšsko

3.2. Chemikálie

3,3'-diaminobenzidin, Sigma, USA

Akrylamid, Sigma, USA

ATP, Sigma, USA

Barevný standard ProSieve, Cambrex Bio Science, USA

BCIP, Sigma, USA

Bisakrylamid, Sigma, USA

Bromfenolová modř, Sigma, USA

BSA, Sigma, USA

Citronan sodný, Penta, ČR

CuSO₄, Lachema

DTT, Sigma, USA

EDTA, Sigma, USA

Ethanol, Lachema, ČR

Folinovo činidlo, Dr. Kulich Pharma

Fosfoenolpyruvát sodný, Sigma, USA

Glycerol, Penta, ČR
 Glycin, Serva, Německo
 HCl, Penta, ČR
 KCl, Lachema, ČR
 K_2HPO_4 , Lachema, ČR
 KH_2PO_4 , PENTA, ČR
 kozí protilátka proti králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfátasou, Sigma, USA
 králičí protilátka proti cytosolovému HSP70, Thermo Fischer Scientific, USA
 králičí protilátka proti PVY^{NTN}, Ústav experimentální botaniky AV ČR
 Kyselina citronová, Lachema, ČR
 Kyselina octová, PENTA, ČR
 L-Malát sodný, Sigma, USA
 Methanol, Penta, ČR
 $MgCl_2$, Sigma, USA
 $Na_2B_4O_7$, PENTA, ČR
 Na_2CO_3 , Lachema, ČR
 NADH, Sigma, USA
 $NADP^+$, Sigma, USA
 $NaHCO_3$, Sigma, USA
 Na_2HPO_4 , PENTA, ČR
 NaH_2PO_4 , PENTA, ČR
 NaN_3 , Fluka, Velká Británie
 NaOH, Lachema, ČR
 Nitroblue tetrazolium, Sigma, USA
 Peroxid vodíku, Penta, ČR
 Peroxodisíran amonný, Sigma, USA
 Phenazin methosulfat, Sigma, USA
 p-nitrofenylfosfát sodný, Sigma, USA
 p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid, Sigma, USA
 p-nitrofenyl- α -D-glukopyranosid, Sigma, USA
 p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosid, Sigma, USA
 p-nitrofenyl- α -D-mannopyranosid, Sigma, USA
 p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-galaktosaminid, Sigma, USA

p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid, Sigma, USA

PVP, Sigma, USA

Pyruvát sodný, Sigma, USA

Sacharosa, Penta, ČR

SDS, Sigma, USA

TEMED, Serva, Německo

Tris (hydroxymethyl)aminomethan, Sigma, USA

Tween 20, Sigma, USA

Vinan sodný, Lachema, ČR

3.3. Rostlinný materiál

Použity byly rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1), pěstované v kultivačních místnostech Ústavu experimentální botaniky Akademie věd s laskavým svolením doc. RNDr. Noemi Čeřovské, CSc.

4. Metody

4.1. Pěstování rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků

Rostliny byly pěstovány ve směsi substrátu a písku (3:1) v kultivační místnosti s umělým osvětlením a klimatizací (cyklus 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplota 20°C, relativní vlhkost 75%, osvětlení 150 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Bylo pěstováno asi 80 rostlin, které byly rozděleny na pět skupin. První skupina rostlin K20 byla po celou dobu (10 týdnů) pěstovaná při 20°C. Táto skupina byla kontrolní skupinou ke skupině K42, která byla vystavená teplotnímu šoku 42°C po dobu 2 hodin v kultivačním boxu. Skupina rostlin označená Y20 byla infikovaná virem PVY^{NTN}. Extrakt pro inokulaci rostlin virem PVY^{NTN} byl připraven smísením infikovaných listů rostlin tabáku s desetinasobkem 0,051 M fosfátového pufru o pH 8,0 a nakonec byl přidán karborundový prášek. Tento extrakt byl nanesen na adaxiální povrch listu.

Rostliny ze skupiny 42Y, byly nejdříve vystaveny teplotnímu šoku (42°C, 2 hodiny) a po uplynutí 1 hodiny byly infikovány virem PVY^{NTN}. Skupina rostlin Y42 byla nejdříve infikována virem PVY^{NTN} a po hodině byla vystavená teplotnímu šoku (42°C, 2 hodiny).

Vzorky skupin rostlin K20 a K42 prvního experimentu byly odebrány v rané fázi pokusu 1 hodinu, 2 hodiny, 3 hodiny po aplikaci HS. Vzorky všech pěti skupin rostlin byly odebrány 1., 5., 8., 12., 15., 22. a 28. den.

Ve druhém experimentu byly vzorky všech skupin rostlin odebrány také 1 hodinu po aplikaci HS a inokulaci virem. Dále byly vzorky všech skupin rostlin odebrány 1. den, 7. den, 14. den, 21. den a 28. den po aplikaci HS a inokulaci virem PVY^{NTN}.

Vzorky byly připraveny odebráním prvních plně vyvinutých listů, ze kterých byla odstraněná střední žilka. V prvním pokusu byly pro každou skupinu odebrány listy ze šestnácti rostlin. Směsné vzorky byly váženy po 0,5 a 1 g. V druhém pokusu každá skupina obsahovala deset rostlin. Směsné vzorky byly váženy po 0,5 g. Následně byly vzorky zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy do hlubobokomrazícího boxu při -80°C.

4.2. Příprava rostlinného extraktu

Rostlinný extrakt byl připraven homogenizací odebraných vzorků rostlin ve třecí misce s trojnásobkem extrakčního pufru A, který obsahoval 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1mM EDTA; 5 mM MgCl₂ a 5 % (v/v) glycerol. Extrakt byl poté převeden do mikrozkuavek, kde bylo přidáno přibližně 0,02 g PVP. Následně byly vzorky centrifugovány 15 minut při 4°C a 16 600 x g. Po centrifugaci vzorků byl supernatant pipetován do mikrozkuavek a použit k měření.

4.3. Imunochemická detekce metodou ELISA

4.3.1. Detekce obalového proteinu PVY^{NTN}

Rostlinný materiál byl homogenizován ve třecí misce s desetinásobkem potahovacího pufru o pH 9,6, který obsahoval 15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃ a 3 mM NaN₃. Po homogenizaci byl extrakt přefiltrován přes gázu a následně bylo 100 µl tohoto extraktu pipetováno do každé jamky mikrotitrační destičky. Jednotlivé vzorky byly na destičku naneseny v tripletech. Destička byla inkubovaná přes noc v lednici při 4°C aby došlo k navázání virových částic na povrch jamek destičky.

Destička byla poté 4x promyta 200 µl promývacího pufru PBS+T (obsahující 8 g NaCl; 2,9 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; 0,2 g KCl a 0,2 g NaN₃ a 0,05% Tween v 1 l destilované

vody). Dalším krokem bylo nanesení 100 μ l králičí protilátky proti PVY^{NTN} o koncentraci 1 μ g/l ředěné v konjugačním pufru (0,2% BSA, 2% PVP v pufru PBS+T) do každé jamky destičky. Destička byla poté inkubovaná 2 hodiny při 37°C.

Po inkubaci následovalo promývání destičky 4x 200 μ l puforem PBS+T. Poté bylo na povrch jamek destičky pipetováno 100 μ l sekundární kozí protilátky proti králičí protilátce značené alkalickou fosfatase. Roztok sekundární kozí protilátky byl připraven smísením protilátky s konjugačním puforem v poměru 1:30 000. Následovala další inkubace destičky při 37°C trvající 3 hodiny.

Po posledním promývání 4x puforem PBS+T následovalo nanesení 100 μ l substrátu pro alkalickou fosfatase. Substrátem pro alkalickou fosfatase byl roztok p-nitrofenylfosfátu v substrátovém pufru o koncentraci 1mg/ml. Substrátový pufr byl připraven smísením 1,4 ml 0,2 M NaHCO₃; 1,1 ml 0,2 M Na₂CO₃; 10 μ l 0,1 M MgCl₂ a 7,5 ml H₂O. Poté byla destička inkubována 1 hodinu při 37°C.

Nakonec byla změřena intenzita žlutého p-nitrofenolu spektrofotometrickým měřením absorbance při 405 nm pomocí čtečky mikrotitračních destiček.

4.3.2. Detekce proteinu HSP70 metodou ELISA

Množství HSP70 bylo v extraktech rostlin detekováno metodou ELISA postupem popsaným v kapitole 4.3.1. s tím rozdílem, že jako primární protilátka byla použita králičí protilátka proti rostlinnému cytosolovému proteinu HSP70 ředěná konjugačním puforem v poměru 1:3000.

4.4. SDS elektroforéza

Jako malopórový dělicí gel byl pro SDS elektroforézu použit 10% gel připravený smísením 4 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,11 ml 10% roztoku SDS; 0,005 ml roztoku TEMED, 4,5 ml destilované vody a 0,11 ml 10% roztoku peroxodisíranu amonného.

Jako velkopórový gel byl připraven 6% roztok akrylamidu obsahující 1 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,05 ml 10% roztoku SDS; 0,004 ml roztoku TEMED a 2,6 ml destilované vody. Polymerace velkopórového gelu byla iniciovaná přidáním 0,05 ml 10% roztoku peroxodisíranu amonného.

Pro SDS elektroforézu byl použit elektrodový pufr o pH 8,3 připravený smísením 18,8 g glycinu; 3g Tris a 1g SDS v 1 l destilované vody.

Vzorky pro elektroforézu byly vytvořeny smísením rostlinného extraktu (připraveného postupem v kapitole 4.2.) se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 tak, aby ve všech vzorcích rostlin byla stejná koncentrace proteinů. Vzorkový pufr obsahoval 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 2 ml 10% SDS; 2 ml glycerolu; 0,1542 g DTT; 0,5 ml 0,1% bromfenolové modři a 2,9 ml destilované vody. Před elektroforézou byly vzorky vloženy do suché lázně po dobu 10 minut při 100°C. Po vychladnutí byly vzorky se stejným množstvím proteinů pipetovány do jamek velkoporového gelu. Do první jamky bylo pipetováno 10 μ l barevného standardu ProSieve.

Při spuštění elektroforézy bylo nastaveno napětí o hodnotě 70 mV a po doputování bromfenolové modři na rozhraní gelů bylo zvýšeno na 140 mV.

Po skončení elektroforézy byl gel dále použit pro přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu a pro imunochemickou detekci proteinu HSP70.

4.5. Imunochemická detekce proteinu HSP70 na nitrocelulosové membráně

4.5.1. Přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu metodou „Western blot“

Do aparatury Biometra pro přenos proteinů byla na 5 vrstev filtračního papíru napuštěného transferovým pufrem umístěna nitrocelulosová membrána určena pro přenos proteinů, rovněž napuštěná transferovým pufrem, a gel po SDS elektroforéze ekvilibrovaný transferovým pufrem. Transferový pufr obsahoval 25 mM Tris-HCl pufr, pH 8,3; 150 mM glycin; 20% methanol. Na gel po SDS elektroforéze bylo umístěno dalších pět vrstev filtračního papíru napuštěných transferovým pufrem. Aparatura byla poté uzavřena a byl nastaven proud rovný pětinasobku obsahu membrány v cm^2 . Přenos proteinů z gelu na membránu trval 35 minut.

4.5.2. Detekce proteinu HSP70 na nitroceluloseové membráně specifickou protilátkou

Nitroceluloseová membrána po přenosu proteinů z gelu byla inkubována 1 hodinu v 1% roztoku BSA v konjugačním pufru. Membrána byla poté třikrát po 5 minutách promyta puftrem PBS+T.

Po promytí byla membrána inkubována přes noc při 4°C v roztoku primární králičí protilátky proti cytosolovému proteinu HSP70 připraveného ředěním protilátky s konjugačním puftrem v poměru 1:3000.

Poté byla membrána promyta v pufru PBS+T třikrát po 5 minutách a následovala další inkubace membrány v roztoku sekundární kozí protilátky proti primární králičí protilátce značené alkalickou fosfatase v konjugačním pufru (1:30 000) po dobu 3 hodin při 37°C.

Dalším krokem bylo promývání membrány v pufru PBS+T třikrát po 5 minutách a membrána byla nakonec vložena do barvicího roztoku, který obsahoval 0,4 mg BCIP; 0,7 mg NBT; 2,8 ml 0,2 M NaHCO₃; 2,2 ml 0,2 M Na₂CO₃ a 15 ml destilované vody.

4.6. Stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu

Aktivita enzymů Hatchova-Slackova cyklu byla stanovena kinetickou spektrofotometrickou metodou.

Pro stanovení aktivity NADP-ME byl měřený nárůst absorpance při 340 nm, který odpovídal množství vytvořeného NADPH+H⁺.

Aktivity enzymů PEPC a PPDK byly stanoveny pomocí metody, při které byla sledovaná spotřeba NADH+H⁺ spřaženou reakcí katalyzovanou MDH odpovídající poklesu absorpance při 340 nm.

Reakční směsi pro stanovení aktivity jednotlivých enzymů byly pipetovány do mikrozkušavek a následně byly temperovány na teplotu 36°C v suché lázni po dobu 5 minut. Iniciační reakce byla provedena přidáním rostlinného extraktu.

4.6.1. Stanovení aktivity NADP–ME

Reakční směs pro stanovení aktivity NADP-ME obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,4; 10 mM L-malát; 2mM MgCl_2 a 0,2 mM NADP^+ . Nakonec bylo k reakční směsi přidáno 50 μl extraktu pro iniciaci enzymové reakce.

4.6.2. Stanovení aktivity PEPC

Aktivita PEPC byla měřena pomocí jednoduché spřažené reakce, ve které byl produkt reakce oxalacetát v přítomnosti $\text{NADH}+\text{H}^+$ přeměňován MDH, obsaženou v rostlinném extraktu.

Reakční směs pro toto stanovení obsahovala: 100 mM Tris-HCl pufr, pH 8,1; 5 mM NaHCO_3 ; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM NADH a 2 mM fosfoenolpyruvát. Enzymová reakce byla iniciována přidáním 20 μl rostlinného extraktu.

4.6.3. Stanovení aktivity PPDK

Pro stanovení aktivity PPDK byla využita dvojitá spřažená reakce. Produkt reakce PEP byl v přítomnosti NaHCO_3 přeměňován PEPC na oxalacetát, který sloužil následně jako substrát pro MDH v přítomnosti $\text{NADH}+\text{H}^+$.

Reakční směs pro stanovení aktivity PPDK obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH 8,1; 10 mM MgCl_2 ; 5 mM NaHCO_3 ; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM Na_2HPO_4 a 0,2 mM NADH. K reakční směsi bylo přidáno 50 μl rostlinného extraktu, čímž byla iniciována enzymová reakce.

4.7. Stanovení aktivity glykosidas

Aktivita glykosidas byla měřena tzv. metodou „end point“ s použitím uměle připravených substrátů glykopyranosidů s navázaným p-nitrofenylem. Reakční směs obsahovala 50 μl 2 mM roztoku substrátu (p-nitrofenyl- α -D-glukopyranosid pro stanovení α -glukosidasy, p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosid pro stanovení aktivity β -glukosidasy, p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid pro stanovení α -galaktosidasy, p-nitrofenyl- α -D-mannopyranosid pro

stanovení aktivity α -mannosidasy, p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid a p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-galaktosaminid pro stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy); 50 μ l 0,2 M citrátového pufru, pH 4,5. Pro iniciaci reakce bylo pipetováno 100 μ l rostlinného extraktu k reakční směsi. Po 20 minutách byla reakce zastavena přidáním 800 μ l borátového pufru o pH 9. Následně byla měřena absorbance při 405 nm oproti slepému pokusu. Reakční směs slepého pokusu měla stejné složení jako stanovovaný vzorek, avšak reakce v něm neproběhla, protože borátový pufr, pH 9 byl pipetován před přidáním enzymu. Aktivita glykosidas byla následně vypočítána použitím molárního absorpčního koeficientu pro p-nitrofenol ($1,8 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.8. Nativní elektroforéza

Pro sledování aktivity a isoenzymového složení NADP-ME a peroxidasy byla zvolena metoda nativní elektroforézy.

Dělicí gradientový gel byl připraven smísením 6% a 12% roztoku akrylamidu pomocí mísiče gradientu. 6% roztok akrylamidu byl připraven smísením 1,2 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 1,6 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,06 ml 10% glycerolu; 0,005 ml roztoku TEMED a 3,2 ml destilované vody. 12% roztok akrylamidu obsahoval 2,4 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 1,6 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,06 ml 10% glycerolu; 0,003 ml roztoku TEMED a 2 ml destilované vody. Iniciace polymerace gelů byla zahájena přidáním 0,06 ml 10% roztoku peroxodisíranu amonného.

Malopórový dělicí gel po polymeraci byl převrstven 3% velkopórovým gelem, obsahujícím 0,4 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 0,5 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,04 ml 10% glycerolu; 0,008 ml roztoku TEMED a 3 ml destilované vody. Nakonec bylo přidáno 0,04 ml 10% roztoku peroxodisíranu amonného, čímž došlo k zahájení polymerace gelu.

Po polymeraci velkopórového gelu byla skla vložena do elektroforetické aparatury Biometra. Následně byl do aparatury nalit elektrodový pufr o pH 8,3 obsahující 18,8 g glycinu; 3 g Tris a 10 ml 10% glycerolu v 1 l destilované vody. Do vrchní části aparatury bylo přidáno 150 μ l 0,1% bromfenolové modři.

V čerstvém extraktu listů tabáku (připravený postupem v kapitole 4.2.) bylo stanoveno množství proteinu postupem popsaným v kapitole 4.9. Poté byl extrakt jednotlivých skupin rostlin naředěn puftrem A tak, aby ve všech extraktech byla stejná koncentrace proteinů.

Takto naředěný čerstvý extrakt listů tabáku v 20% (w/v) sacharose byl aplikován do jednotlivých jamek.

Po uzavření aparatury bylo napětí na přístroji nastaveno na 70 mV a po doběhnutí bromfenolové modři na rozhraní gelů bylo navýšeno na 140 mV. Po skončení elektroforézy byl gel převeden do Petriho misky s reakční směsí pro detekci enzymů.

4.8.1. Detekce NADP-ME v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze

Pro detekci enzymu NADP-ME po nativní elektroforéze byla připravená reakční směs obsahující 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,4; 10 mM L-malát; 10 mM $MgCl_2$; 1,5 mg/ml $NADP^+$; 0,005 mg/ml nitroblue tetrazolium a 0,005 mg/ml phenazin methosulfát.

4.8.2. Detekce peroxidasy v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze

Reakční směs pro detekci peroxidasy po nativní elektroforéze obsahovala 0,02 g 3,3'-diaminobenzidinu v 5 ml destilovaného 96% ethanolu; 14 ml 0,5 M fosfátového pufru, pH 7,0; 0,2 ml 30% peroxidu vodíku a 800 μ l destilované vody.

4.9. Stanovení množství proteinů Lowryho metodou

Pro vlastní stanovení proteinů byl použit extrakt listů tabáku připravený postupem v kapitole 4.2. 10 μ l tohoto extraktu bylo pipetováno do mikrozkušavky spolu s 190 μ l destilované vody. Roztok blanku byl připraven smísením 10 μ l pufru A s 190 μ l destilované vody. Poté byl ke zředěným extraktům a blanku pipetován 1 ml roztoku C (50 ml 2% roztoku Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH a 1 ml 0,5% roztoku $CuSO_4$ v 1% vinanu sodném) a po 10 minutové inkubaci bylo pipetováno 100 μ l Folinova činidla ředěného v destilované vodě v poměru 1:1. Po 30 minutách inkubace byla měřená absorbance vzorků proti blanku při 500 nm.

Pro kalibraci stanovení proteinů Lowryho metodou bylo připraveno šest 200 µl roztoků BSA v destilované vodě o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml, které byly zpracovány stejným způsobem jako vzorky.

4.10. Stanovení hmotnosti sušiny

Ve druhém pokusu byla ve vzorcích stanovená hmotnost sušiny. Vzorky listů tabáku připravené postupem v kapitole 4.1. byly přeneseny do mikrozkušavek a sušeny v suché lázni (Major Science, USA) při 70°C po dobu 48 hodin. Vyschlé vzorky listů byly poté zváženy.

5. Výsledky

V rostlinách tabáku byl sledován vliv kombinace stresových faktorů (teplotního šoku a virové infekce) na metabolismus rostlin, množství proteinu HSP70 a na množství viru PVY^{NTN} v infikovaných rostlinách.

Studium kombinace těchto stresových faktorů v rostlinách tabáku bylo provedeno ve třech pokusech, z nichž v této práci jsou uvedeny pokusy dva. Ve všech pokusech byly rostliny pěstovány v kultivačních místnostech za konstantních podmínek (20°C, vlhkost 75%, osvětlení 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, cyklus 16 hod. světla a 8 hod. tmy). Pro vlastní experiment byly rostliny rozděleny do pěti skupin. Kromě kontrolní skupiny (K20) a dvou skupin vystavených působení jen jednoho stresového faktoru: teplotnímu šoku (K42) nebo infekci Y viru bramboru (Y20), byly další dvě skupiny vystaveny kombinaci výše zmíněných stresových faktorů. Skupina rostlin nejdříve vystavených působení teplotního šoku (42°C po dobu 2 hod.) a po 1 hodině inokulovaná Y virem bramboru (42Y) byla studována odděleně od skupiny rostlin nejdříve inokulovaných virem PVY^{NTN} a po hodině vystavených 2-hodinovému působení teploty 42°C (Y42).

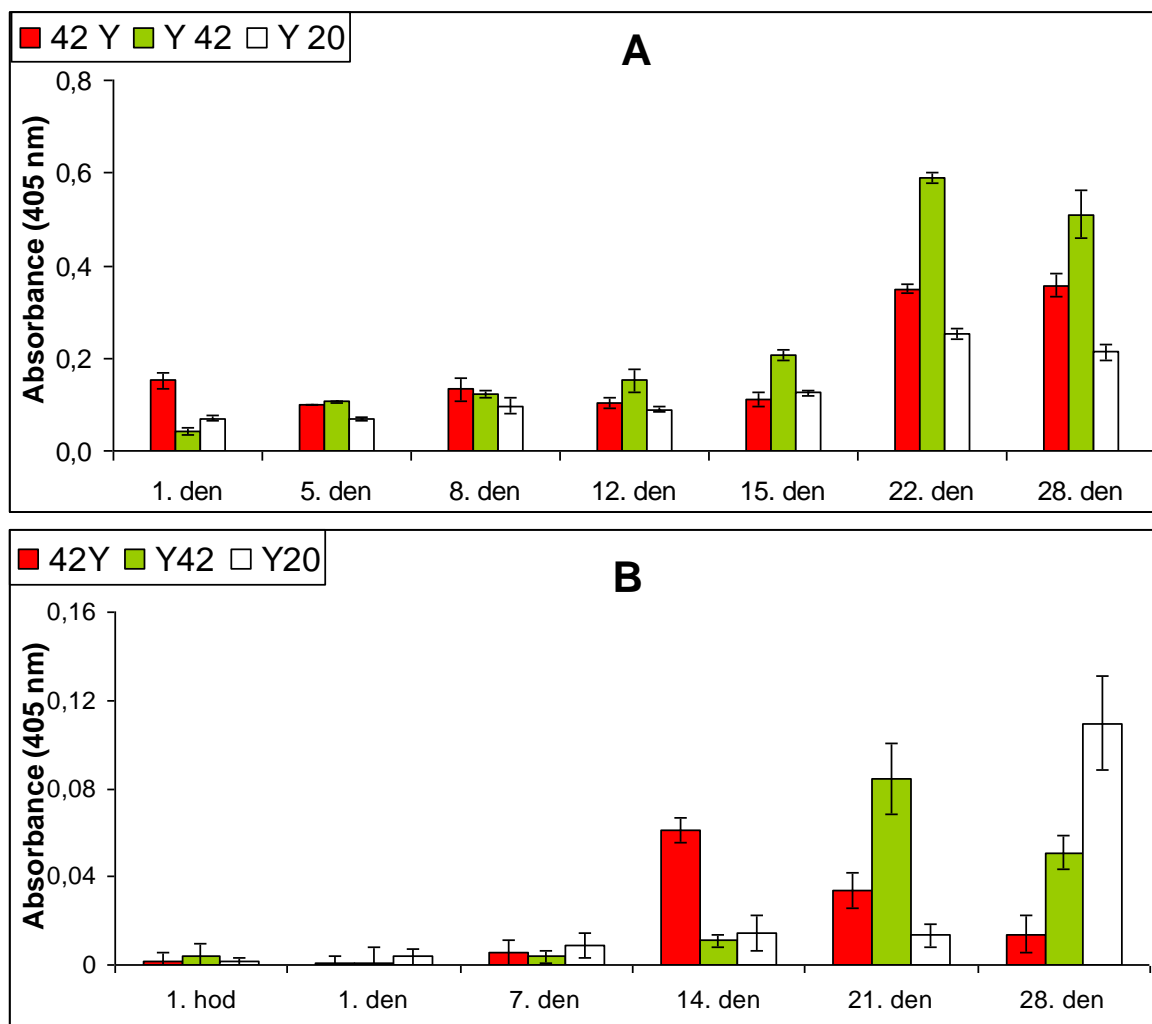
5.1. Vliv teplotního šoku na množství viru PVY^{NTN} v rostlinách tabáku

Množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} bylo detekováno metodou ELISA. Relativní obsah viru byl stanoven v listech všech skupin infikovaných rostlin (42Y, Y42 a Y20).

V prvním pokusu bylo největší zvýšení relativního množství proteinu PVY^{NTN} detekováno 22. a 28. den po inokulaci, a to ve všech skupinách. Z těchto skupin nejvyšší hodnoty relativního obsahu viru vykazovala skupina Y42. Přestože relativní obsah viru stále dosahoval nejvyšších hodnot, 28. den došlo v této skupině k mírnému poklesu obsahu množství viru, zatímco ve skupinách 42Y a Y20 se jeho množství nezměnilo (obr. 7. graf A).

Množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} bylo rovněž stanoveno ve druhém pokusu. Ve druhém pokusu byly mezi jednotlivými skupinami oproti prvnímu pokusu zaznamenány rozdíly v časovém průběhu virové infekce. Výsledky ukazují, že již 14. den po inokulaci došlo u skupiny rostlin 42Y k dosažení maxima obsahu viru. V dalších dnech se množství viru PVY^{NTN} ve skupině 42Y snižovalo. Největší množství viru ve skupině Y42 bylo detekováno 21. den, přičemž pokles relativního množství viru ve skupině Y42

byl detekován 28. den po inokulaci, podobně jako v prvním pokusu. Rozdíl oproti prvnímu pokusu byl zjištěn ve skupině Y20, a to především 28. den infekce, kdy bylo detekováno největší množství viru. (obr. 7. graf B).



Obr. 7. Detekce množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} metodou ELISA ve skupině 42Y, Y42 a Y20 v prvním pokusu (graf A) a ve druhém pokusu (graf B). Na ose y je vynesena absorbance p-nitrofenolu a na ose x je doba po inokulaci PVY^{NTN}. 42Y – skupina vystavená působení teplotního šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná virem PVY^{NTN} a poté vystavená působení teplotního šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

Jednotlivé hodnoty množství viru PVY^{NTN} ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 byly statisticky porovnány metodou ANOVA. Výsledek je uveden v tabulce 3. V prvním pokusu byly nejvýznamnější rozdíly zaznamenány 15. den mezi skupinami Y20 a Y42, 22. den mezi všemi skupinami a poslední 28. mezi skupinami Y20 a Y42. Ve druhém pokusu byly nejvýznamnější rozdíly detekovány mezi skupinami rostlin vystavených kombinovanému stresu 42Y a Y42 14. den infekce a také 28. den mezi skupinami Y20 a 42Y.

Tab. 3. Statistické vyhodnocení srovnání množství viru PVY^{NTN} ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 pro 1. a 2. pokus

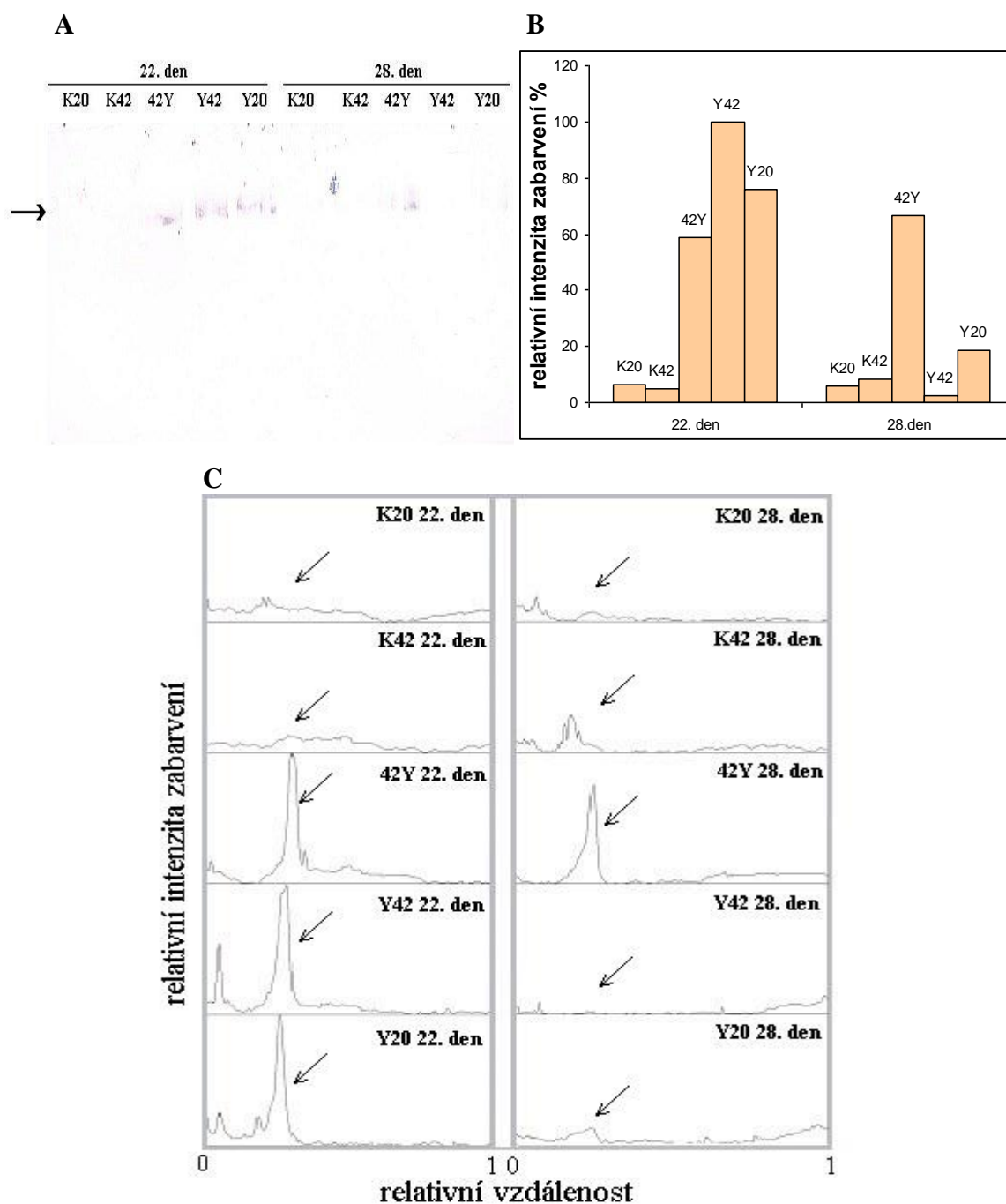
1. pokus			2. pokus		
Den	Srovnání skupin	p	Den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 – 42Y	0,2617	14. den	Y20 – 42Y	0,0012 *
	Y20 – Y42	0,0005 *		Y20 – Y42	0,5049
	42Y – Y42	0,0010 *		42Y – Y42	0,0002 *
22. den	Y20 – 42Y	0,0003 *	21. den	Y20 – 42Y	0,0200 *
	Y20 – Y42	$3,4 \cdot 10^{-6}$ *		Y20 – Y42	0,0019 *
	42Y – Y42	$1,06 \cdot 10^{-5}$ *		42Y – Y42	0,0086 *
28. den	Y20 – 42Y	0,0010 *	28. den	Y20 – 42Y	0,0020 *
	Y20 – Y42	0,0007 *		Y20 – Y42	0,0115 *
	42Y – Y42	0,0100 *		42Y – Y42	0,0049 *

* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$

5.2. Vliv teplotního šoku a virové infekce na množství proteinu HSP70

Množství proteinu HSP70 bylo stanoveno pomocí dvou metod. Jednalo se o imunochemickou detekci HSP70 na nitrocelulosové membráně a metodu ELISA na mikrotitrační destičce.

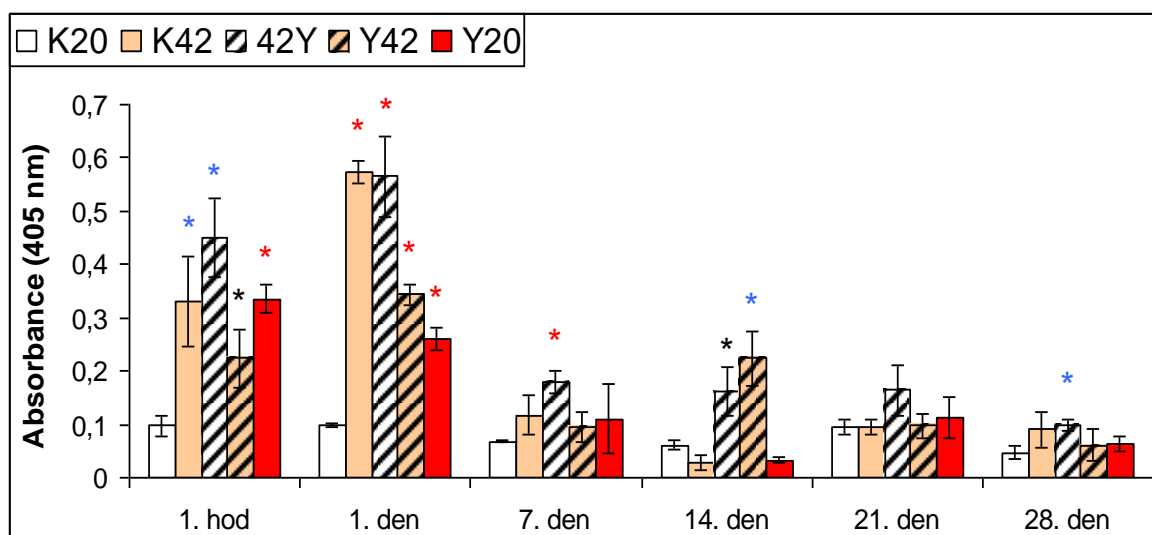
V prvním pokusu bylo množství proteinu HSP70 detekováno imunochemickou detekcí na nitrocelulosové membráně 22. a 28. den odběru, kdy byl již obsah viru v infikovaných rostlinách vysoký. Ve všech skupinách infikovaných rostlin (42Y, Y42 a Y20) bylo 22. den detekováno zvýšené množství proteinu HSP70 v porovnání s kontrolními skupinami K20 a K42. Množství proteinu HSP70 22. den korelovalo s množstvím viru PVY^{NTN}. Avšak 28. den bylo zvýšené množství HSP70 detekováno jen ve skupině 42Y (obr. 8.).



Obr. 8. Imunochemická detekce proteinu HSP70 v prvním pokusu. Nitrocelulosová membrána po imunochemické detekci HSP70 v rostlinných extraktech odebraných 22. a 28. den infekce, šipka ukazuje na molekulovou hmotnost přibližně 70 kDa (obr. A), grafické znázornění densitometrického vyhodnocení intenzity proužku (obr. B) a densitometrické vyhodnocení intenzity proužku programem Image J, šipky ukazují na pík odpovídající HSP70 (obr. C). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

Ve druhém pokusu bylo množství proteinu HSP70 stanoveno nejprve metodou ELISA ve všech odběrových dnech (obr. 9). Imunochemická detekce HSP70 na nitroceluloseové membráně byla poté provedená pro 14. a 21. den odběru, kdy se zdá být interakce HSP70 s virovými proteiny důležitá (obr. 10).

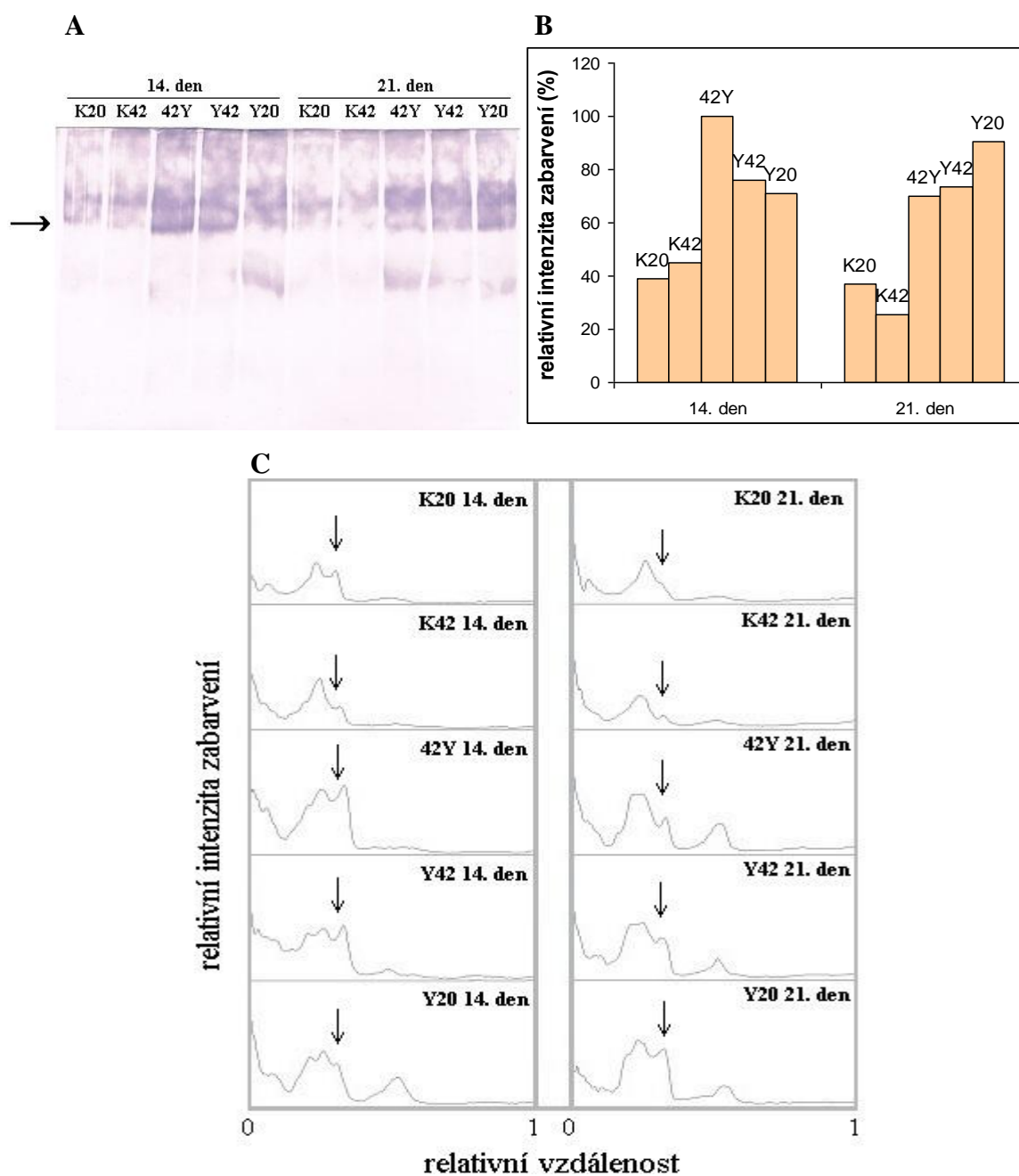
Obr. 9. ukazuje výsledek kvantifikace HSP70 metodou ELISA ve druhém pokusu. Největší zvýšení HSP70 bylo detekováno již 1. hodinu po aplikaci teplotního šoku ve skupinách vystavených teplotnímu šoku (K42, 42Y a Y42) a rovněž ve skupině Y20. Podobný trend byl detekován i 1. den po aplikaci teplotního šoku a inokulaci PVY^{NTN}. Až 14. den byl detekován nárůst HSP70, pravděpodobně související s probíhající virovou infekcí, a to ve skupinách vystavených kombinovanému stresu (42Y a Y42). Další odběrové dny již rozdíl v obsahu proteinu HSP70 mezi stresovanými a kontrolními skupinami nebyly tak významné.



Obr. 9. Stanovení množství proteinu HSP70 ve druhém pokusu metodou ELISA. Na ose y je vynesena absorbance p-nitrofenolu a na ose x doba po inokulaci a aplikaci HS. Statisticky významné rozdíly všech skupin v porovnání s kontrolní skupinou jsou v grafu vyznačeny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

Protože hlavním cílem práce bylo zjistit, zda rostlinný protein HSP70 v průběhu virové infekce pomáhá rostlině nebo viru, byl imunochemickou detekcí HSP70 na nitrocelulosové membráně stanoven obsah tohoto proteinu 14. a 21. den odběru, kdy obsah viru je na rozdíl od 1. hodiny již znatelný.

Oba tyto dny bylo množství HSP70 v infikovaných skupinách zvýšené oproti skupinám kontrolním (obr. 10.). Zvýšené množství HSP70 ve skupině 42Y 14. den korelovalo se stanoveným množstvím viru PVY^{NTN} (obr. 7., graf B). Další odběrový den (21. den) došlo ke snížení množství HSP70 ve skupině 42Y, zatímco ve skupině Y42 se množství HSP70 v porovnání s 14. dnem nezměnilo, zároveň ale došlo ke zvýšení množství HSP70 ve skupině Y20 (obr. 10.).



Obr. 10. Imunochemická detekce proteinu HSP70 ve skupinách rostlin druhého pokusu. Nitrocelulosoová membrána po imunochemické detekci HSP70 v rostlinných extraktech odebraných 14. a 21. den infekce, šipka ukazuje na molekulovou hmotnost přibližně 70 kDa (obr. A), grafické znázornění densitometrického vyhodnocení intenzity proužku (obr. B) a densitometrické vyhodnocení intenzity proužku programem Image J, šipky ukazují na pík odpovídající HSP70 (obr. C). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

5.3. Obsah sušiny v rostlinách vystavených stresu

Vzhledem k tomu, že působením teplotního šoku na rostliny by mohlo dojít ke snížení obsahu vody v rostlinách, byl ve druhém pokusu ve všech skupinách rostlin stanoven obsah sušiny v % v listech. Z výsledků uvedených v tab. 4. vyplývá, že vlivem zvýšené teploty nedošlo v rostlinách vystavených HS ke snížení obsahu vody.

Snížení množství vody nebylo detekováno ani ve skupinách vystavených kombinovanému stresu nebo samotné virové infekci v porovnání s kontrolní skupinou rostlin v posledních odběrových dnech.

Tab. 4. Stanovení obsahu sušiny v listech rostlin tabáku ve druhém pokusu

1. hod odběru		1. den odběru		7. den odběru	
skupina	% sušiny	skupina	% sušiny	skupina	% sušiny
K20	12,7	K20	12,0	K20	16,5
K42	12,0	K42	11,0	K42	14,4
42Y	10,2	42Y	9,0	42Y	14,1
Y42	11,3	Y42	9,5	Y42	13,2
Y20	10,0	Y20	10,4	Y20	14,8
14. den odběru		21. den odběru		28. den odběru	
skupina	% sušiny	skupina	% sušiny	skupina	% sušiny
K20	16,8	K20	24,1	K20	27,5
K42	15,3	K42	19,5	K42	21,9
42Y	14,0	42Y	15,1	42Y	18,2
Y42	12,1	Y42	12,9	Y42	14,7
Y20	15,2	Y20	14,2	Y20	14,6

5.4. Vliv kombinace teplotního a biotického stresu na metabolismus rostlin tabáku

Působení kombinovaného stresu na rostlinu bylo studováno i na metabolické úrovni, a to stanovením aktivit enzymů Hatchova Slackova cyklu, glykosidas a rozpustných peroxidas v listech rostlin všech pěti skupin (K20, K42, 42Y, Y42 a Y20). Spektrofotometrické stanovení enzymů Hatchova-Slackova cyklu a glykosidas bylo provedeno v tripletech, statisticky významné rozdíly oproti kontrolním skupinám rostlin (K20) jsou znázorněny symbolem *.

5.4.1. Vliv teplotního stresu a virové infekce na aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu

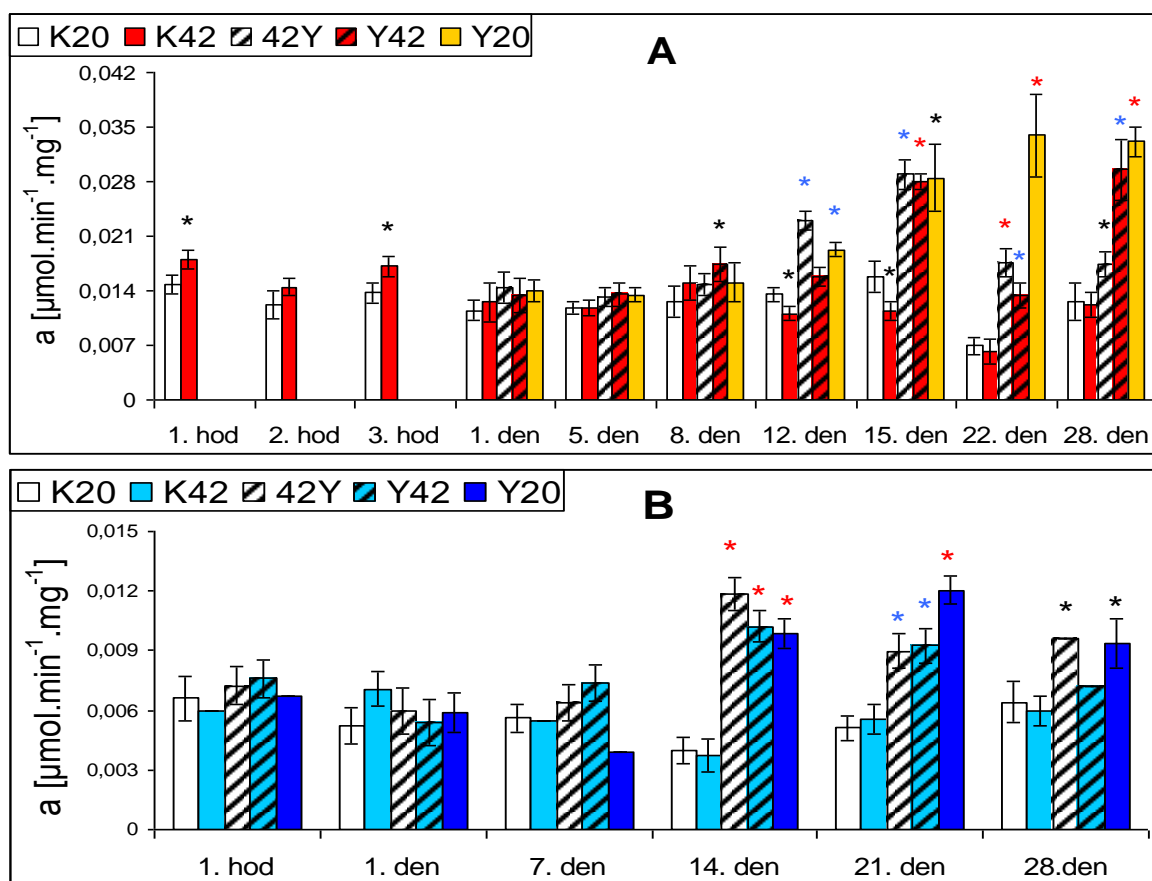
Aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu byly na základě předchozích výsledků [137-139] použity jako markery virové infekce rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. Pomocí změn specifických aktivit těchto enzymů ve skupinách rostlin s kombinovaným stresem byl také sledován vliv teplotního šoku na rozvoj virové infekce. Specifická aktivita PEPC, NADP-ME a PPDK se v kontrolních skupinách významně neměnila, zatímco ve skupinách stresovaných rostlin docházelo v některých odběrových dnech ke statisticky významným změnám aktivit (obr. 11., 12., 15.).

5.4.1.1. Aktivita PEPC

V infikovaných skupinách rostlin bylo pozorováno významné zvýšení aktivity PEPC v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 11.).

V prvním pokusu byla zjištěná zvýšená aktivita PEPC ve skupinách K42 v porovnání se skupinami K20 pro první tři odběry (1., 2. a 3. hod.). Dále došlo ke zvýšení aktivity PEPC v infikovaných skupinách rostlin 15., 22. a 28. den odběru. Maximum aktivity PEPC bylo detekováno ve skupině Y20 22. a 28. den. Aktivita PEPC byla 22. den ve skupině Y20 o 390% větší než ve skupině K20 a 28. den o 160% větší než K20 (obr. 11, graf A).

Ve druhém pokusu došlo k nárůstu aktivity enzymu PEPC v infikovaných skupinách rostlin 14., 21. a 28. den odběru. Maxima aktivity PEPC bylo dosaženo 14. den ve skupině 42Y (o 200% větší než K20) a také 21. den ve skupině Y20 (o 140% větší než K20) (obr. 11., graf B).



Obr. 11. Specifická aktivita PEPC vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a ve druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly všech skupin v porovnání s kontrolní skupinou (K20) jsou v grafu vyznačeny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

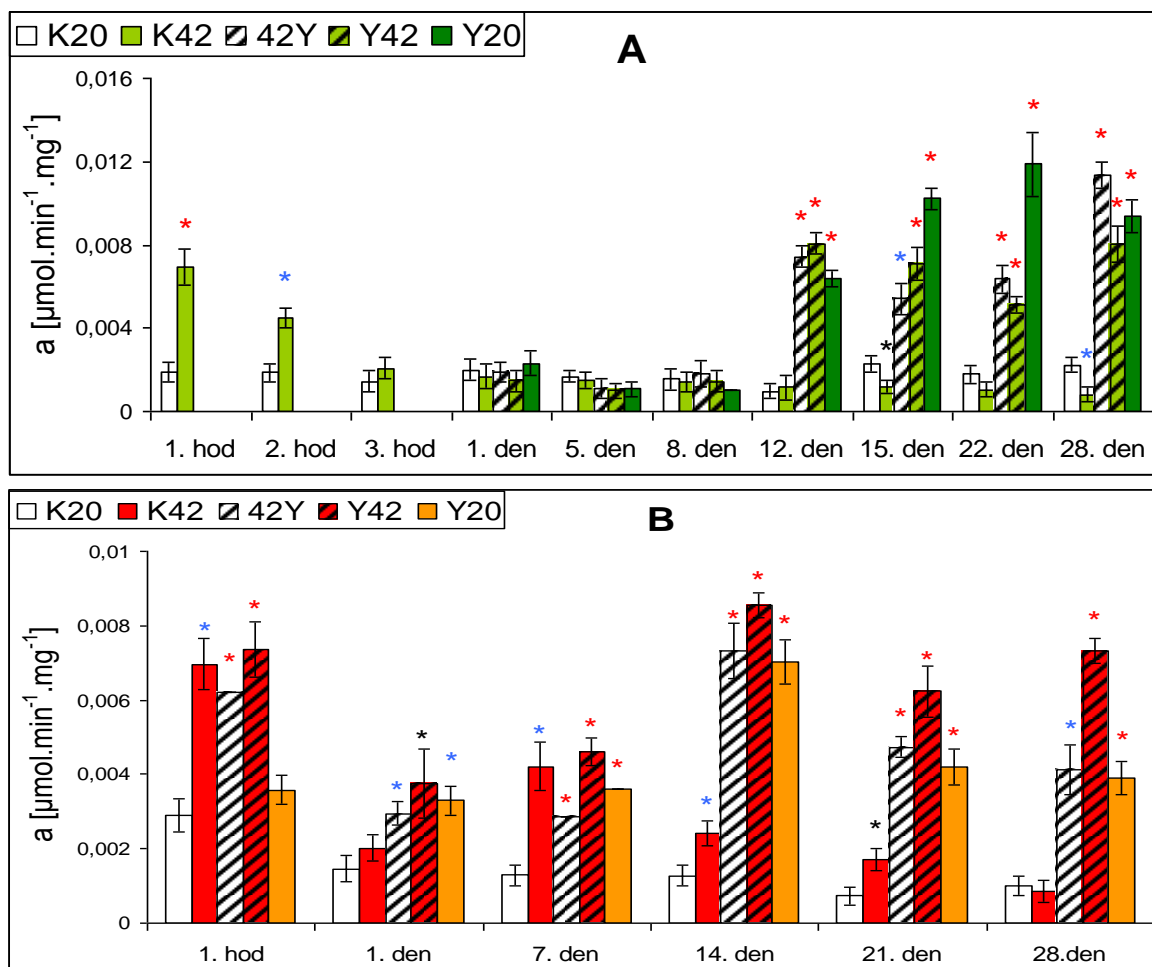
5.4.1.2. Aktivita NADP-ME

Dalším sledovaným enzymem Hatchova-Slackova cyklu byla NADP-ME. Ve skupinách rostlin vystavených působení stresu došlo ke zvýšení aktivity NADP-ME (obr. 12.).

V prvním pokusu měla skupina rostlin K42 zvýšenou aktivitu enzymu NADP-ME o 220%, 140% a 44% v porovnání se skupinou K20 v první třech odběrech (1. až 3. hod). Další odběrové dny byl zjištěn nárůst aktivity v infikovaných skupinách: 42Y, Y42 a Y20 oproti skupinám K20 a K42. Aktivita NADP-ME byla ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 12. den až sedminásobně větší než ve skupině K20 a K42. Dále došlo ke zvýšení aktivity NADP-ME ve skupině Y20 15. a 22. den odběru, kdy měla skupina Y20 až pětinašobně větší aktivitu

než kontrolní skupina. Poslední 28. den aktivita NADP-ME ve skupině Y20 mírně klesla, přičemž nejvyšší aktivitu vykazovala skupina 42Y (rozdíl 410% od kontrolní skupiny).

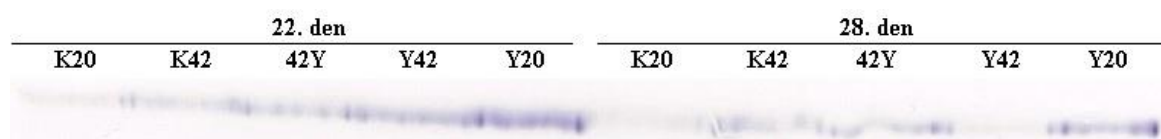
Ve druhém pokusu byla první hodinu po aplikaci HS a inokulaci rostlin PVY^{NTN} detekovaná zvýšená aktivita NADP-ME ve skupinách vystavených teplotnímu šoku: K42, 42Y a Y42. K dalšímu výraznému nárůstu aktivity NADP-ME došlo 14., 21. a 28. den odběru. V těchto všech odběrových dnech byla nejvyšší aktivita NADP-ME ve skupině Y42.



Obr. 12. Specifická aktivita NADP-ME vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a ve druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami rostlin a kontrolní skupinou (K20) jsou znázorněny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

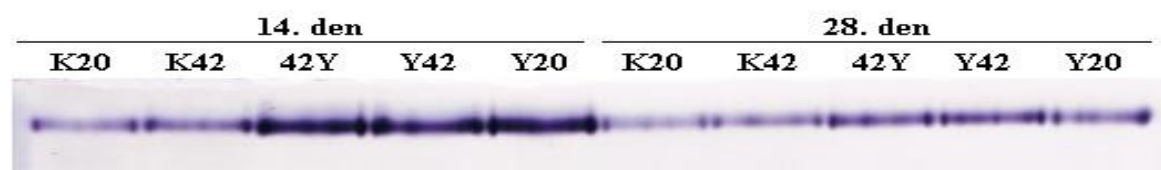
Aktivita NADP-ME byla detekována i v gelu po nativní elektroforéze. Odběrové dny, ve kterých byla tímto postupem aktivita NADP-ME stanovená, byly vybrány z výsledků spektrofotometrického stanovení aktivity NADP-ME (obr. 12.).

V prvním pokusu byla detekována aktivita NADP-ME ve dvou posledních odběrech, a to 22. a 28. den. Zvýšení aktivity NADP-ME bylo 22. den detekováno ve skupině Y20 v porovnání s ostatními skupinami a 28. den byla největší aktivita NADP-ME detekována ve skupinách 42Y a Y20 (obr. 13.). Výsledky se shodují se spektrofotometrickým stanovením NADP-ME (obr. 12., graf A).



Obr. 13. Detekce aktivity NADP-ME v extraktech listů rostlin prvního pokusu separovaných nativní elektroforézou v gradientovém 6-12% polyakrylamidovém gelu. Do jamek bylo aplikováno 95 µg proteinů. K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

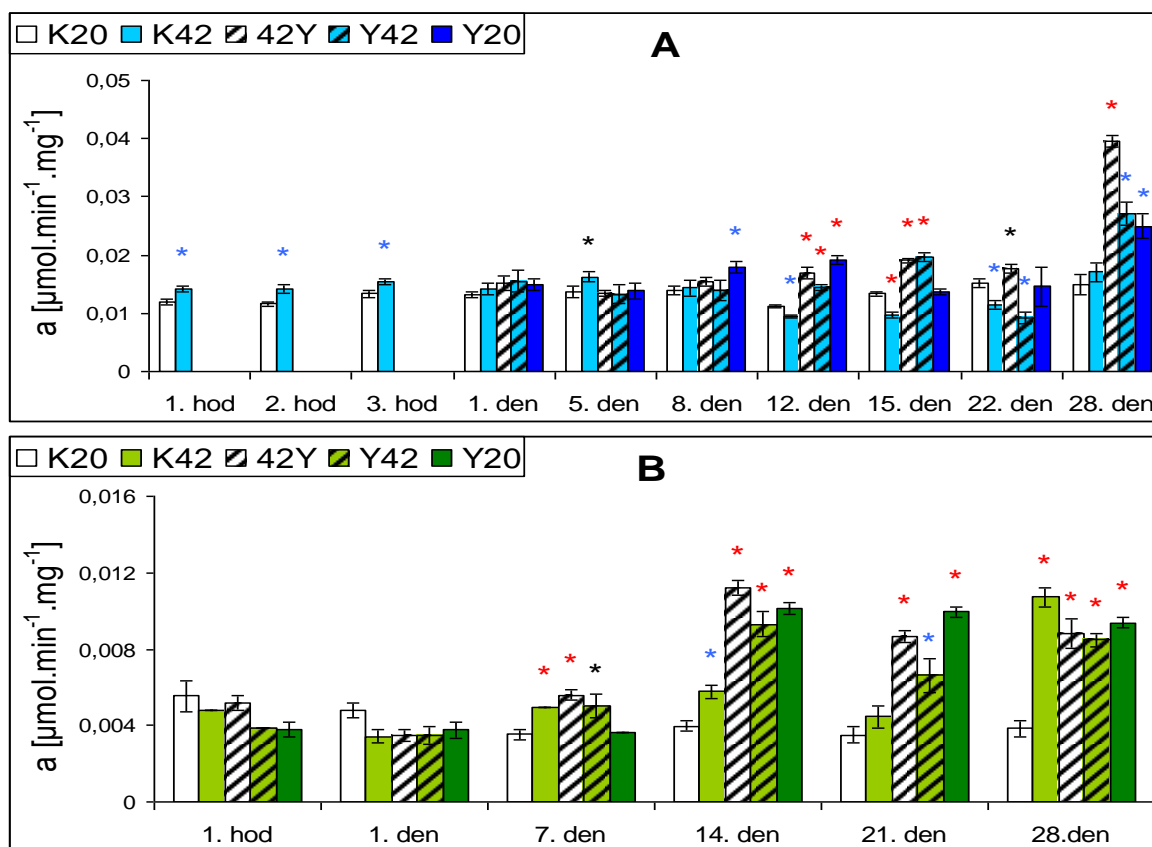
Ve druhém pokusu byla aktivita NADP-ME po nativní elektroforéze stanovena 14. a 28. den. Maximum aktivity NADP-ME bylo zaznamenáno 14. den ve skupinách 42Y, Y42 a Y20. Aktivita NADP-ME byla 28. den v infikovaných skupinách (42Y, Y42 a Y20) vyšší než ve skupinách K20 a K42 (obr. 14.).



Obr. 14. Detekce aktivity NADP-ME v extraktech listů rostlin druhého pokusu separovaných nativní elektroforézou v gradientovém 6-12% polyakrylamidovém gelu. Do jamek bylo aplikováno 110 µg proteinů. K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

5.4.1.3. Aktivita PPK

Posledním stanoveným enzymem Hatchova-Slackova cyklu byla PPK. Zvýšení aktivity PPK bylo detekováno ve skupinách vystavených působení stresových podmínek (obr. 15.). V prvním pokusu došlo k mírnému nárůstu aktivity PPK v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20) 12. až 28. den odběru. Maximum aktivity PPK bylo zjištěno poslední den odběru ve skupině 42Y. Aktivita PPK se v této skupině lišila o 170% od kontrolní skupiny (obr. 15., graf A). Ve druhém pokusu došlo k mírnému zvýšení aktivity PPK již 7. den odběru ve skupinách K42, 42Y a Y42. Další odběrové dny byla aktivita PPK zvýšená hlavně v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20). Maximum aktivity PPK bylo zjištěno 14. den ve skupině 42Y (obr. 15., graf B).



Obr. 15. Specifická aktivita PPK vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a ve druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly stresovaných rostlin od kontrolní skupiny (K20) jsou v grafu znázorněny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

5.4.2. Vliv kombinovaného stresu na aktivity glykosidas

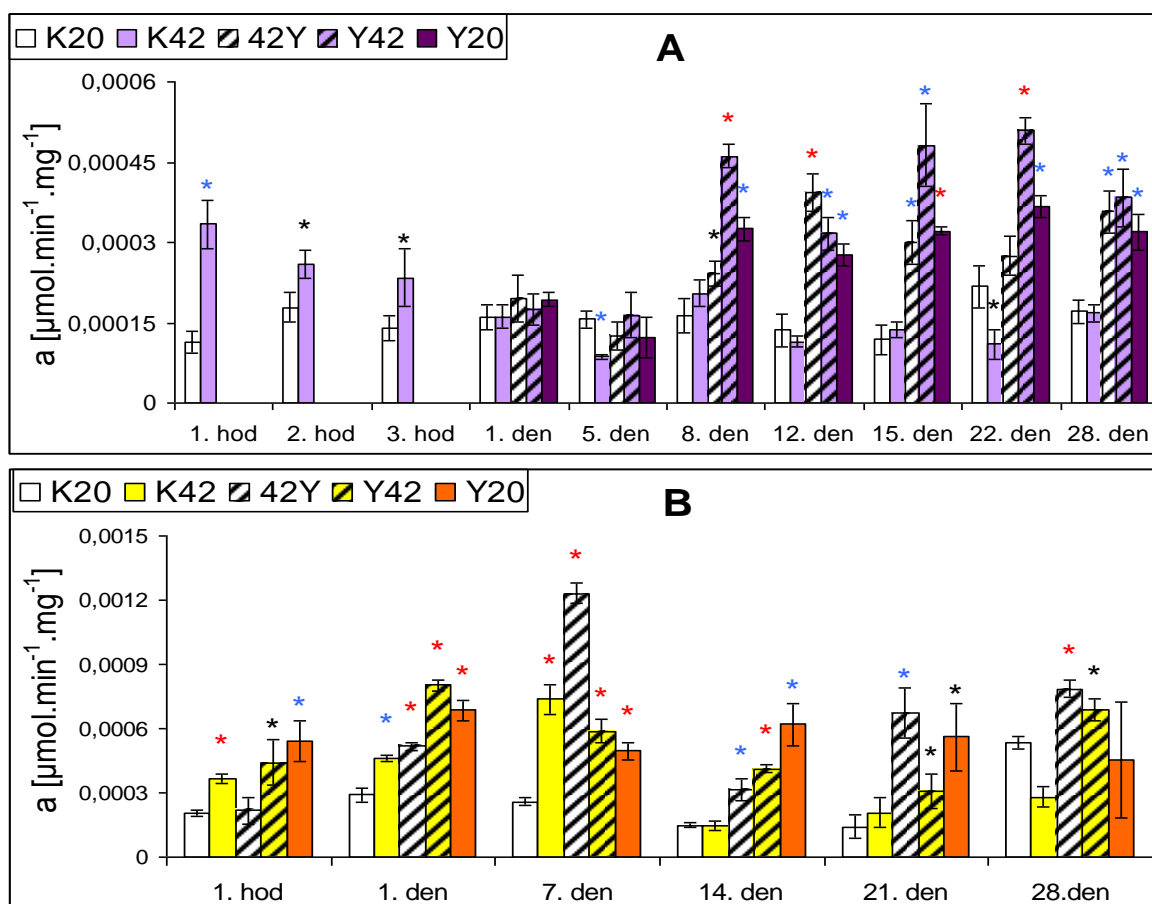
V obou biologických pokusech byly také stanoveny aktivity glykosidas. Ve všech skupinách rostlin byly aktivity glykosidas stanoveny v tripletech. Aktivity glykosidas kontrolních skupin rostlin se významně neměnily, zatímco u skupin stresovaných rostlin byl detekován nárůst aktivity glykosidas v porovnání s kontrolními skupinami. Statisticky významné rozdíly stresovaných skupin rostlin od kontrolní skupiny (K20) jsou označeny symbolem *.

5.4.2.1. Aktivita α -glukosidasy

V obou pokusech docházelo ke zvýšení aktivity α -glukosidasy ve skupinách stresovaných rostlin v porovnání s kontrolními skupinami (obr. 16.).

V prvním pokusu byl pozorován rozdíl mezi aktivitami α -glukosidasy v kontrolní skupině (K20) a skupině vystavené teplotnímu šoku (K42) 1., 2. a 3. hodinu po aplikaci HS. Vyšší aktivita byla detekována ve skupině vystavené HS (rozdíl 200% pro 1. hod., 50% pro 2. hod. a 70% pro 3. hod.). Maximum aktivity α -glukosidasy bylo detekováno ve skupině Y42 a to hned v několika odběrech (8., 15. a 22. den). Aktivita α -glukosidasy ve skupině Y42 se 8. den lišila od kontrolní skupiny o 180%, 15. den odběru o 310% a 22. den se aktivita Y42 lišila od K20 o 120% (obr. 16., graf A).

Ve druhé pokusu došlo v prvním odběru (1. hod.) k nárůstu aktivity α -glukosidasy ve skupinách K42, Y42 a Y20 v porovnání s kontrolní skupinou. Maximum aktivity α -glukosidasy bylo stanoveno již 7. odběrový den ve skupině 42Y (rozdíl 380% od K20). Další dny (21. a 28. den) byly aktivity α -glukosidasy ve skupinách infikovaných rostlin mírně zvýšeny v porovnání s kontrolní skupinou (K20) (obr. 16., graf B).



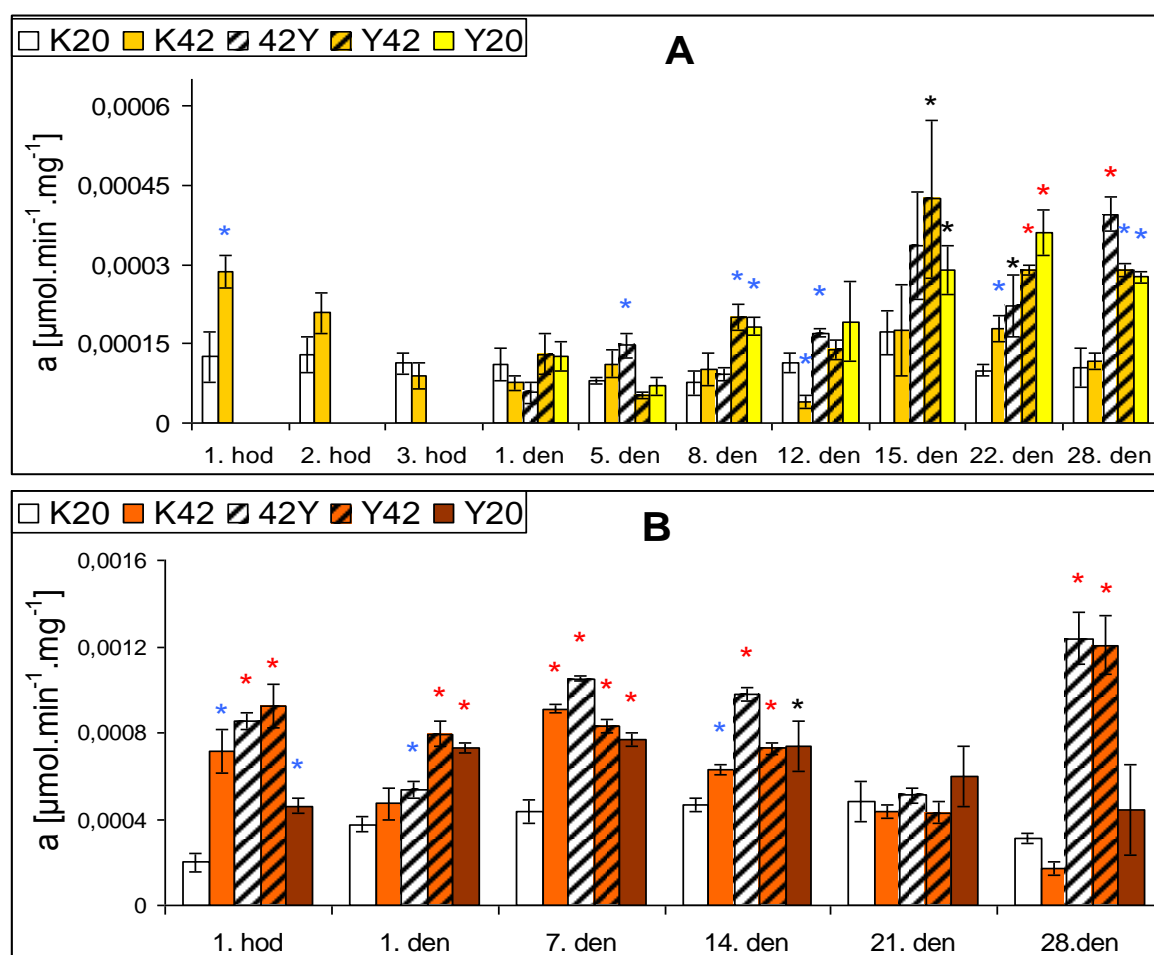
Obr. 16. Specifická aktivita α -glukosidasy vztážená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a ve druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami a kontrolní skupinou (K20) jsou označeny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

5.4.2.2. Aktivita β -glukosidasy

V obou pokusech docházelo ke zvýšení aktivity β -glukosidasy ve skupinách stresovaných rostlin, přičemž aktivita kontrolních skupin se výrazně neměnila (obr. 17.).

V prvním pokusu byly detekovány rozdíly v aktivitě β -glukosidasy způsobené teplotním šokem. Aktivita β -glukosidasy byla 1. hod. ve skupině K42 o 130% větší než ve skupině K20. Maximum aktivity β -glukosidasy bylo detekováno ve skupině Y42 15. den odběru (rozdíl 150% v porovnání s K20).

Ve druhém pokusu byl rovněž pozorován nárůst aktivity β -glukosidasy 1 hodinu po aplikaci HS ve skupinách rostlin vystavených teplotnímu šoku (K42, 42Y, Y42). Maximum aktivity β -glukosidasy bylo zjištěno poslední 28. odběrový den ve skupinách rostlin vystavených kombinovanému stresu (42Y a Y42). Aktivita β -glukosidasy v skupinách vystavených kombinovanému stresu se 28. den lišila od kontrolní skupiny o 300%.



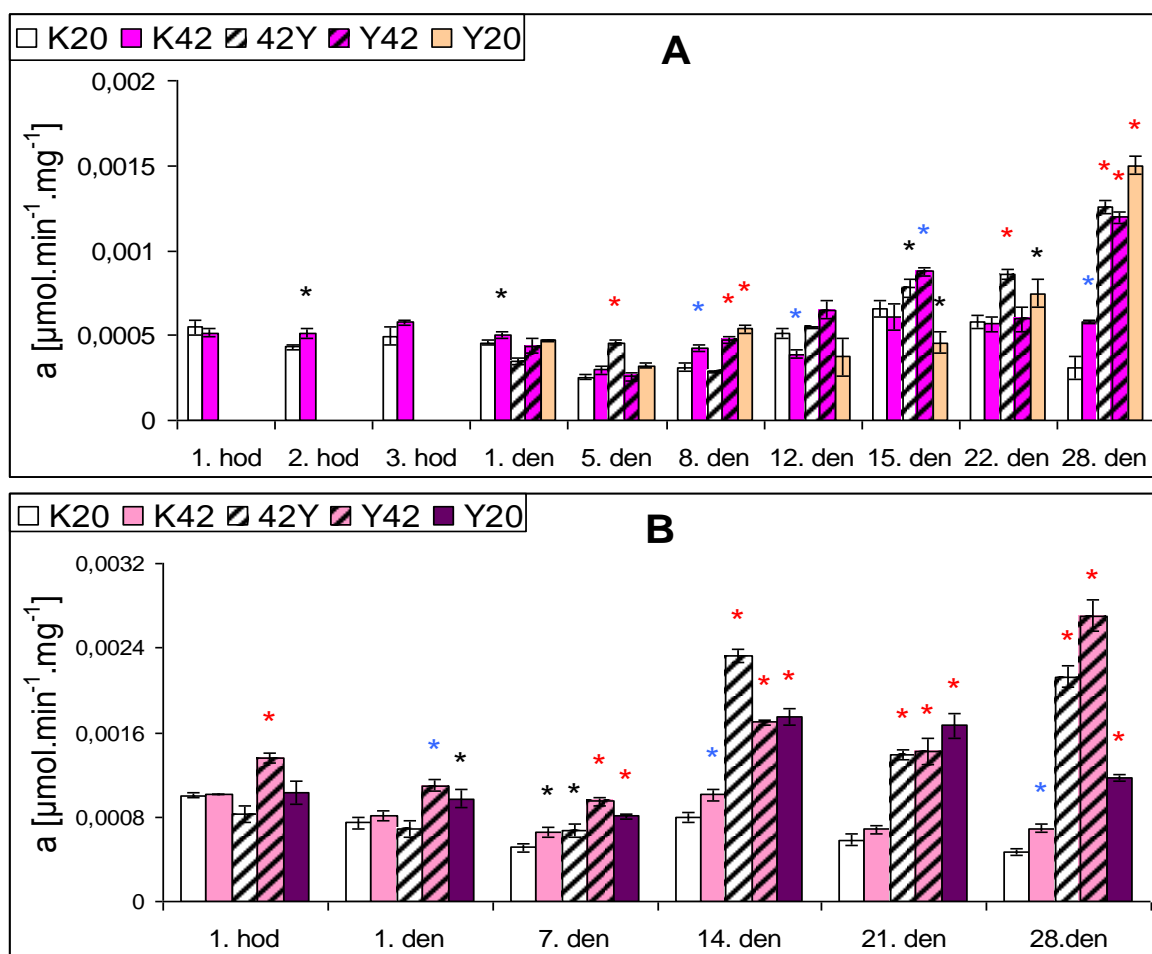
Obr. 17. Specifická aktivita β -glukosidasy vztahovaná na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami rostlin a kontrolní skupinou (K20) jsou označeny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

5.4.2.3. Aktivita α -galaktosidasy

Nárůst aktivity α -galaktosidasy byl pozorován v infikovaných skupinách v obou pokusech (obr. 18.).

V prvním pokusu (obr. 18., graf A) bylo maximum aktivity α -galaktosidasy detekováno ve skupině Y20, 42Y a Y42 poslední – 28. odběrový den. Aktivita α -galaktosidasy ve skupině rostlin Y20 byla až čtyřnásobně větší než aktivita kontrolní skupiny K20.

Ve druhém pokusu (obr. 18., graf B) byl nárůst aktivity α -galaktosidasy zaznamenán 14. den odběru v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20). Další 21. den následovalo snížení aktivity α -galaktosidasy ve skupině 42Y a Y42 v porovnání s předchozím odběrem. Maximum aktivity α -galaktosidasy bylo stanoveno poslední 28. den odběru ve skupině Y42 (rozdíl 480% od K20).



Obr. 18. Specifická aktivita α -galaktosidasy vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami rostlin a kontrolní skupinou (K20) jsou znázorněny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

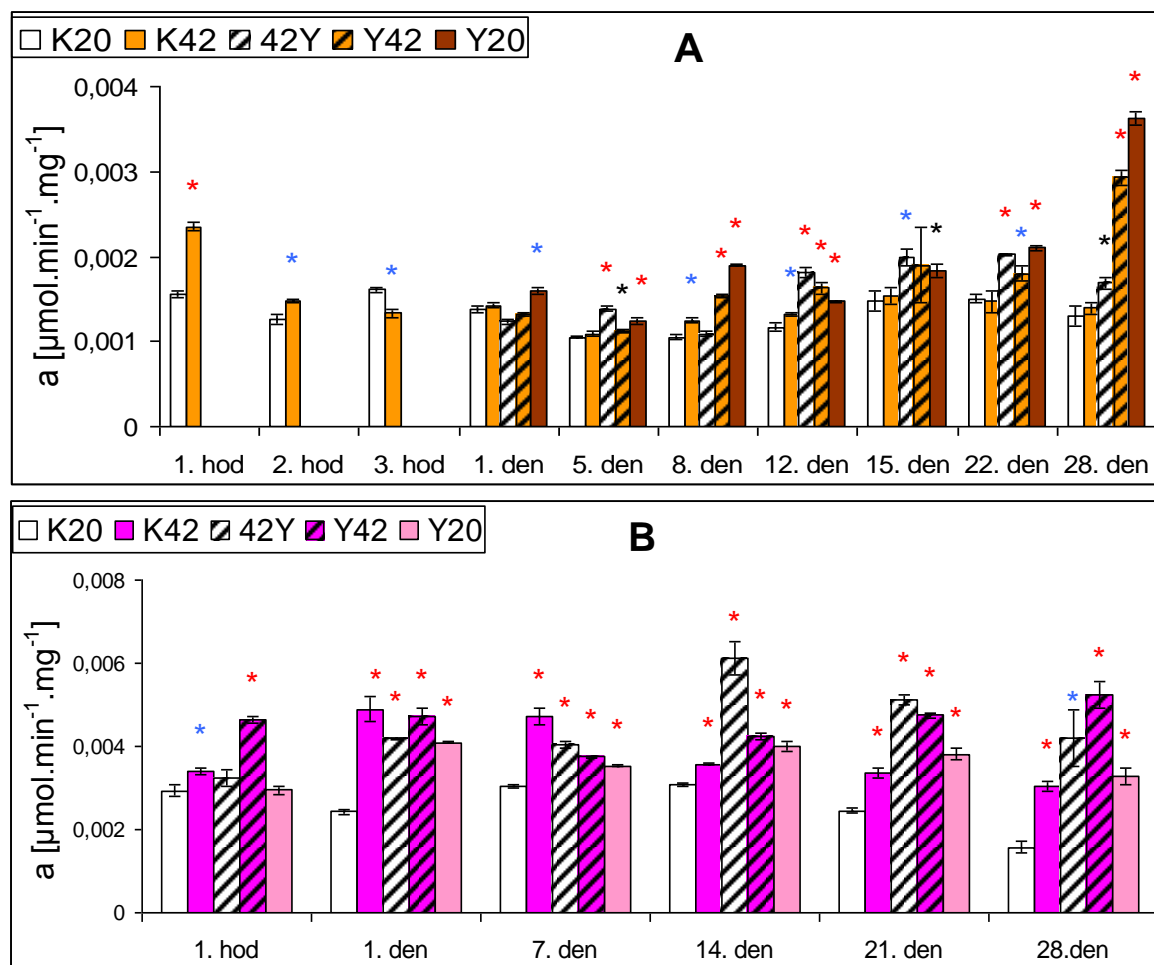
5.4.2.4. Aktivita α -mannosidasy

Změny aktivity α -mannosidasy byly zaznamenány ve skupinách rostlin vystavených působení stresových podmínek (obr. 19.).

Pro skupiny rostlin v prvním pokusu byly zjištěny výrazné změny aktivit α -mannosidasy ve vzorcích odebraných 1 hodinu po aplikaci HS, kdy byla aktivita α -mannosidasy větší ve skupině vystavené teplotnímu šoku. V dalších odběrech byl pozorován jen mírný nárůst aktivity α -mannosidasy v infikovaných skupinách oproti skupinám K20 a K42. Maximum

aktivity α -mannosidasy bylo detekováno 28. den ve skupině Y20. Hodnota naměřené aktivity ve skupině Y20 se od skupiny K20 lišila o 180%.

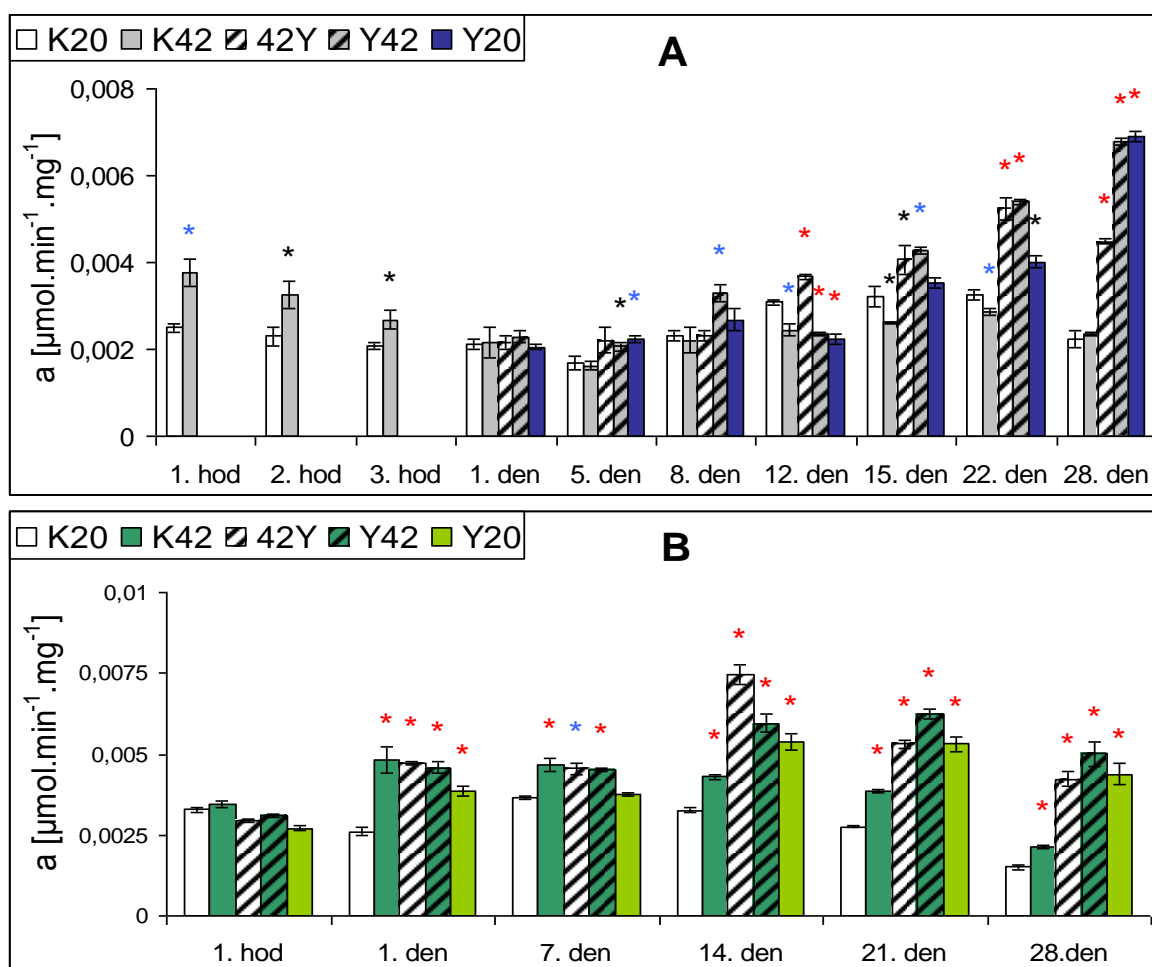
Ve druhém pokusu bylo maximum aktivity α -mannosidasy detekováno 14. den odběru ve skupině 42Y (rozdíl 100% od K20). V dalších odběrových dnech (21. a 28. den) byla zvýšená aktivita α -mannosidasy detekována ve skupinách rostlin vystavených kombinovanému stresu (42Y a Y42) v porovnání s kontrolními skupinami rostlin.



Obr. 19. Specifická aktivita α -mannosidasy vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a ve druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami rostlin a kontrolní skupinou (K20) jsou znázorněny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

5.4.2.5. Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy

V prvním pokusu (obr. 20., graf A) byl pozorován vliv teplotního šoku na zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy 1., 2. a 3. hodinu odběru. K největšímu zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy ve skupině vystavené teplotnímu šoku došlo 1. hod. po aplikaci teplotního šoku. Ve skupinách infikovaných PVY^{NTN} byl pozorován nárůst aktivity β -N-acetylhexosaminidasy 15., 22. a 28. den odběru. Největší hodnota aktivity β -N-acetylhexosaminidasy byla detekována 28. den ve skupinách Y42 a Y20 (rozdíl 300% od K20). Ve druhém pokusu (obr. 20., graf B) došlo ke zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy ve skupinách vystavených teplotnímu šoku v porovnání s kontrolní skupinou 1 den po aplikaci HS. Významné zvýšení aktivit β -N-acetylhexosaminidasy bylo zaznamenáno 14., 21. a 28. den v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20). Maximum aktivity β -N-acetylhexosaminidasy v těchto odběrových dnech bylo detekováno ve skupině 42Y 14. den odběru (rozdíl 130% od K20).



Obr. 20. Specifická aktivita β -N-acetylhexosaminidasy vztažená na množství rozpustných proteinů v prvním (graf A) a druhém (graf B) pokusu. Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými skupinami a kontrolní skupinou (K20) jsou znázorněny hvězdičkou (* - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$). K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}. 1.–3. hodinu prvního pokusu (graf A) nebyly aktivity enzymu ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 detekovány.

5.4.3. Statistické vyhodnocení rozdílů aktivit enzymů mezi infikovanými skupinami rostlin

Pomocí programu ANOVA byly hodnoty detekovaných aktivit enzymů Hatchova-Slackova cyklu a glykosidas ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 statisticky porovnány (tab. 5., 6. a 7.).

Z výsledku statistického srovnání těchto hodnot je zřejmé, že aktivity enzymů se ve skupinách vystavených kombinovanému stresu a samostatné virové infekci výrazně

nelišily. Největší rozdíl byl detekován pro enzym α -galaktosidasa 28. den mezi skupinou infikovanou PVY^{NTN} (Y20) a skupinami vystavenými působení kombinovaného stresu (42Y a Y42).

Tab. 5. Statistické vyhodnocení srovnání aktivit enzymů PEPC, NADP-ME a PPDK ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 pro první a druhý pokus * - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$

PEPC					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,999	14. den	Y20 - 42Y	0,045 *
	Y20 - Y42	0,924		Y20- Y42	0,615
	42Y - Y42	0,897		42Y - Y42	0,083
22. den	Y20 - 42Y	0,005 *	21. den	Y20 - 42Y	0,012 *
	Y20 - Y42	0,315		Y20 - Y42	0,489
	42Y - Y42	0,209		42Y - Y42	0,222
28. den	Y20 - 42Y	0,206	28. den	Y20 - 42Y	0,862
	Y20 - Y42	0,793		Y20 - Y42	0,040 *
	42Y - Y42	0,222		42Y - Y42	0,033 *
NADP-ME					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,011 *	14. den	Y20 - 42Y	0,345
	Y20 - Y42	0,346		Y20 - Y42	0,367
	42Y - Y42	0,101		42Y - Y42	0,898
22. den	Y20 - 42Y	0,003 *	21. den	Y20 - 42Y	0,124
	Y20 - Y42	0,555		Y20 - Y42	0,501
	42Y - Y42	0,169		42Y - Y42	0,576
28. den	Y20 - 42Y	0,885	28. den	Y20 - 42Y	0,041 *
	Y20 - Y42	0,880		Y20 - Y42	0,463
	42Y - Y42	0,956		42Y - Y42	0,344
PPDK					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,001 *	14. den	Y20 - 42Y	0,045 *
	Y20 - Y42	0,418		Y20 - Y42	0,615
	42Y - Y42	0,115		42Y - Y42	0,083
22. den	Y20 - 42Y	0,517	21. den	Y20 - 42Y	0,012 *
	Y20 - Y42	0,714		Y20 - Y42	0,489
	42Y - Y42	0,758		42Y - Y42	0,222
28. den	Y20 - 42Y	0,194	28. den	Y20 - 42Y	0,862
	Y20 - Y42	0,705		Y20 - Y42	0,040 *
	42Y - Y42	0,155		42Y - Y42	0,033 *

Tab. 6 . Statistické vyhodnocení srovnání aktivit enzymu α -glukosidasy, β -glukosidasy a α -galaktosidasy ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 pro první a druhý pokus

*** - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$**

α-glukosidasa					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,279	14. den	Y20 - 42Y	0,025 *
	Y20 - Y42	0,451		Y20 - Y42	0,340
	42Y - Y42	0,421		42Y - Y42	0,155
22. den	Y20 - 42Y	0,308	21. den	Y20 - 42Y	0,210
	Y20 - Y42	0,346		Y20 - Y42	0,307
	42Y - Y42	0,677		42Y - Y42	0,799
28. den	Y20 - 42Y	0,124	28. den	Y20 - 42Y	0,209
	Y20 - Y42	0,485		Y20 - Y42	0,862
	42Y - Y42	0,170		42Y - Y42	0,092
β-glukosidasa					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,663	14. den	Y20 - 42Y	0,561
	Y20 - Y42	0,529		Y20 - Y42	0,584
	42Y - Y42	0,429		42Y - Y42	0,252
22. den	Y20 - 42Y	0,031 *	21. den	Y20 - 42Y	0,135
	Y20 - Y42	0,050		Y20 - Y42	0,802
	42Y - Y42	0,122		42Y - Y42	0,288
28. den	Y20 - 42Y	0,261	28. den	Y20 - 42Y	0,003 *
	Y20 - Y42	0,643		Y20 - Y42	0,575
	42Y - Y42	0,286		42Y - Y42	0,140
α-galaktosidasa					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,003 *	14. den	Y20 - 42Y	0,536
	Y20 - Y42	0,467		Y20 - Y42	0,691
	42Y - Y42	0,186		42Y - Y42	0,459
22. den	Y20 - 42Y	0,443	21. den	Y20 - 42Y	0,049 *
	Y20 - Y42	0,284		Y20 - Y42	0,346
	42Y - Y42	0,931		42Y - Y42	0,473
28. den	Y20 - 42Y	0,002 *	28. den	Y20 - 42Y	10 ⁻⁵ *
	Y20 - Y42	0,492		Y20 - Y42	10 ⁻⁵ *
	42Y - Y42	0,196		42Y - Y42	0,005 *

Tab. 7. Statistické vyhodnocení srovnání aktivit enzymu α -mannosidasy a β -N-acetylhexosaminidasy ve skupinách 42Y, Y42 a Y20 pro první a druhý pokus * - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$

α-mannosidasa					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,730	14. den	Y20 - 42Y	0,236
	Y20 - Y42	0,776		Y20 - Y42	0,924
	42Y - Y42	0,651		42Y - Y42	0,244
22. den	Y20 - 42Y	0,060	21. den	Y20 - 42Y	0,001 *
	Y20 - Y42	0,408		Y20 - Y42	0,411
	42Y - Y42	0,524		42Y - Y42	0,090
28. den	Y20 - 42Y	0,041 *	28. den	Y20 - 42Y	0,088
	Y20 - Y42	0,375		Y20 - Y42	0,001 *
	42Y - Y42	0,130		42Y - Y42	0,079
β-N-acetylhexosaminidasa					
1. pokus			2. pokus		
den	Srovnání skupin	p	den	Srovnání skupin	p
15. den	Y20 - 42Y	0,001 *	14. den	Y20 - 42Y	0,107
	Y20 - Y42	0,475		Y42 - Y42	0,924
	42Y - Y42	0,118		42Y - Y42	0,116
22. den	Y20 - 42Y	0,001 *	21. den	Y20 - 42Y	0,973
	Y20 - Y42	0,449		Y42 - Y42	0,004 *
	42Y - Y42	0,156		42Y - Y42	0,001 *
28. den	Y20 - 42Y	0,322	28. den	Y20 - 42Y	0,220
	Y20 - Y42	0,541		Y42 - Y42	0,639
	42Y - Y42	0,357		42Y - Y42	0,626

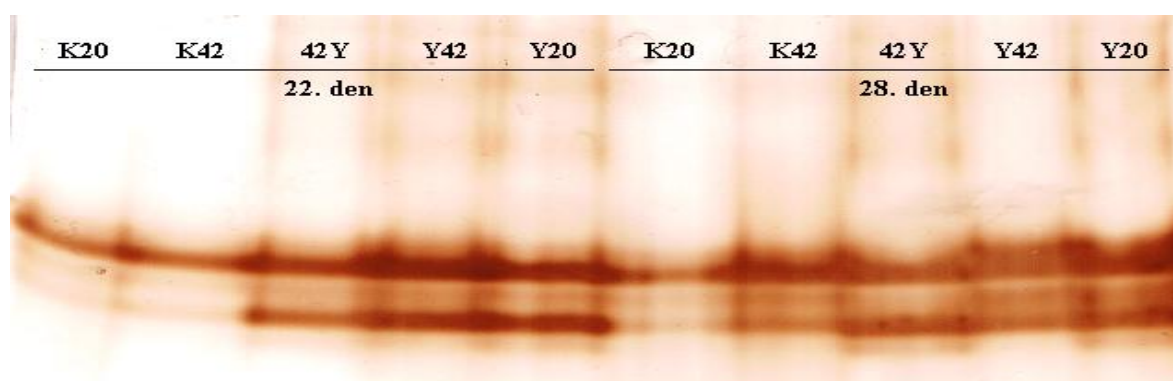
5.4.4. Vliv kombinace teplotního šoku a biotického stresu na aktivitu a isoenzymové složení peroxidasy

Vliv stresových faktorů (teplotní šok a virová infekce) a jejich kombinace na aktivitu antioxidačního enzymu – peroxidasy byl zkoumán v obou pokusech. Aktivita a isoenzymové složení peroxidasy byly detekovány v gradientovém gelu po nativní elektroforéze.

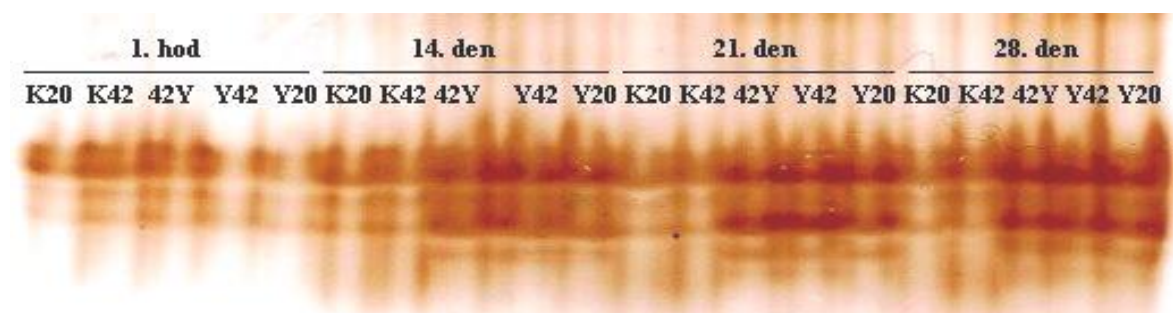
V prvním pokusu byla aktivita peroxidasy detekována pro 22. a 28. den odběru. Aktivita peroxidasy byla 22. den zvýšená v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20), kdy došlo i ke změnám isoenzymového složení peroxidasy v porovnání se skupinou K20 a K42. Rovněž byla aktivita peroxidasy zvýšená v infikovaných skupinách rostlin i 28. den. V tento den došlo ale i ke zvýšení aktivity peroxidasy ve skupině K42 a ke změně isoenzymového složení peroxidasy v této skupině v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 21.).

Ve druhém pokusu byla aktivita peroxidasy a její isoenzymové složení detekováno ve skupinách rostlin odebraných 1. hod., 14., 21. a 28. den. Vlivem teplotního šoku došlo 1. hod. k mírnému zvýšení aktivity peroxidasy a ke změnám isoenzymového složení ve skupinách K42, 42Y a Y42. Další dny (14., 21. a 28. den) byla aktivita peroxidasy zvýšená v infikovaných skupinách rostlin (42Y, Y42 a Y20). V těchto skupinách došlo i ke změnám isoenzymového složení peroxidasy (obr. 22.).

Samotná virová infekce a teplotní šok, nebo jejich kombinace způsobily změny v zastoupení jednotlivých isoform rozpuštěných peroxidas. V extraktech stresovaných rostlin (K42, 42Y, Y42 a Y20) byly detekovány isoformy s vyšší pohyblivostí v porovnání s kontrolní skupinou (K20) (obr. 21 a 22.).



Obr. 21. Detekce aktivity a isoenzymového složení peroxidasy po nativní elektroforéze v gradientovém 6-12% polyakrylamidovém gelu v 1. pokusu. Do jamek bylo aplikováno 95 µg proteinů. K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.



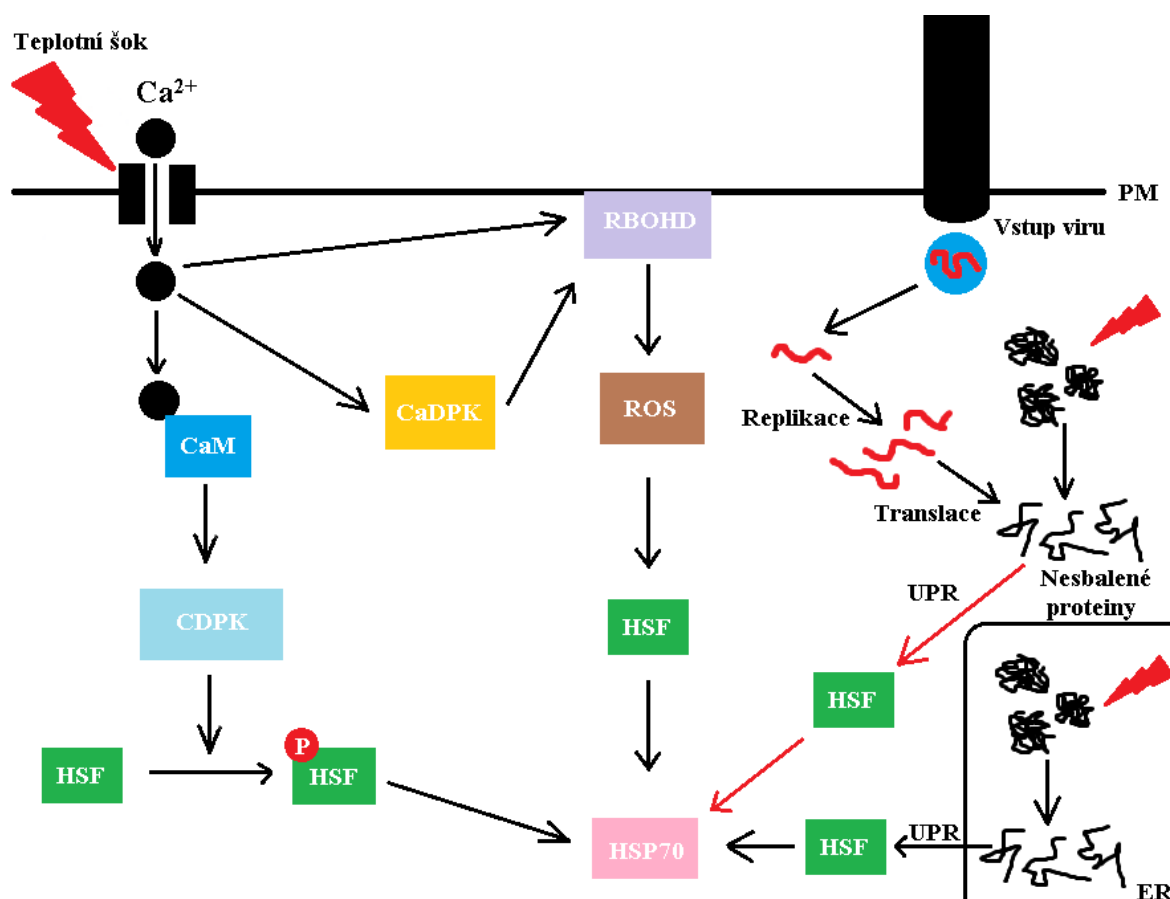
Obr. 22. Detekce aktivity a isoenzymového složení peroxidasy po nativní elektroforéze v gradientovém 6-12% polyakrylamidovém gelu ve 2. pokusu. Do jamek bylo aplikováno 48 µg proteinů. K20 – kontrolní skupina, K42 – skupina rostlin vystavených teplotnímu šoku, 42Y – skupina vystavená teplotnímu šoku a poté inokulovaná virem PVY^{NTN}, Y42 – skupina inokulovaná PVY^{NTN} a poté vystavená teplotnímu šoku, Y20 – skupina inokulovaná PVY^{NTN}.

6. Diskuze

Proteiny HSP70 jako chaperony jsou klíčovými molekulami v buňce. Podílejí se na správném sbalení nově syntetizovaných proteinů i částečně denaturovaných proteinů a brání jejich agregaci [56-58]. Vlivem různých stresových podmínek dochází k denaturaci proteinů, ke zvýšené syntéze některých proteinů a tedy stoupá význam HSP70 pro buňku [56]. Typickým příkladem takových stresů je zvýšená teplota – teplotní šok nebo virová infekce, při které dochází k syntéze velkého množství virových proteinů. Funkce HSP70 v případě virové infekce však není jednoznačná.

Není zřejmé, zda proteiny HSP70 jsou součástí obranné odpovědi rostliny podobně jako u abiotických stresových faktorů, nebo zda napomáhají viru v jeho multiplikaci a šíření rostlinou. Například bylo zjištěno, že na jednu stranu teplotní stres inhibuje hypersenzitivní odpověď tabáku vůči viru tabákové mozaiky a bramboru vůči X viru bramboru [3, 6], na druhou stranu zvýšená teplota zvyšuje obrannou odpověď (umlčování RNA) v rostlinách *N. benthamiana* infikovaných virem kroužkovitosti čelunatce [8].

Existují studie, ze kterých vyplývá, že rostlinné proteiny HSP70 jsou důležitou součástí procesů infekčního cyklu viru, např. u mutantních rostlin neobsahující gen pro HSP70 dochází k vyšší odolnosti vůči virové infekci (tab. 1, str. 16). U některých virů bylo dokonce zjištěno, že si tvoří virové homology HSP70, které umožňují jejich translokaci [83, 84]. Na druhou stranu v jiných modelových systémech se zdá být zvýšené zastoupení HSP70 spojeno s opětovným ustavením rovnováhy proteinů a navozením rezistence [85, 86]. Rostliny pravděpodobně mohou v rámci zkřížené obrany využít proteiny HSP70 nabyté abiotickým stresem k obranné odpovědi vůči biotickému stresu. Společné komponenty signálních kaskád teplotního stresu a stresu způsobeného rostlinným virem a jejich možný synergický účinek vyjadřuje následující hypotetický model na obr. 23.



Obr. 23. Vlivem teplotního šoku dochází ke zvýšení fluidity plasmatické membrány (PM) [97]. Následkem zvýšené membránové fluidity se otevírají kanály pro vápenaté ionty, čímž se zvyšuje koncentrace Ca^{2+} v buňce. Vápenaté ionty se vážou na kalmodulin za vytvoření komplexu, který interaguje s kalmodulin dependentními proteinkinasami (CDPK), které se podílejí na fosforylaci (aktivaci) transkripčních faktorů teplotního šoku (HSF). HSF následně indukují expresi proteinů HSP70 [98-100, 177]. Zvýšené hladiny cytosolových Ca^{2+} iontů také aktivují enzym produkující ROS - RBOHD (z angl. respiratory burst oxidase homolog D) lokalizovaný na plasmatické membráně. K aktivaci enzymu dochází přímo vápenatými ionty nebo po působení Ca^{2+} dependentních proteinkinas (CaDPK). Aktivaci RBOHD se zvyšuje množství ROS v buňce, čímž dochází k aktivaci HSF a následně ke zvýšené expresi HSP70 [102, 103]. Příčinou zvýšené syntézy HSP70 vlivem tepla a také virové infekce je nahromadění agregovaných a denaturovaných proteinů v buňce. V cytosolu a ER dochází k odpovědi na zvýšenou koncentraci nesbalených proteinů - UPR (z angl. unfolded protein response), tím že se v těchto částech buňky zvyšuje množství proteinů HSP70 [97, 178]. Signální dráha vedoucí ke zvýšení hladiny HSP70 společná pro teplotní šok a také virovou infekci je znázorněná červenou šipkou.

V praxi se využívá také princip termoterapie, kdy infikované rostliny jsou postupně vystaveny vyšším a vyšším teplotám, čímž dochází k ozdravení rostliny (tab. 2., str. 18).

Mechanismus tohoto procesu však není znám a odpověď vůči dlouhodobému působení zvýšené teploty se pravděpodobně odlišuje od působení teplotního šoku.

V této práci byla sledován vliv teplotního šoku aplikovaného jak před tak po inokulaci na rozvoj infekce PVY^{NTN} v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR).

Z výsledků této práce vyplývá, že množství viru PVY^{NTN} detekované metodou ELISA je v rostlinách vystavených teplotnímu šoku (Y42, 42Y) vyšší než v kontrolní skupině (Y20) pěstované při konstantní teplotě 20°C a konstantních dalších podmínkách jako je osvětlení, relativní vlhkost vzduchu, režim noc/den (obr. 7, graf A, str. 42). Ve druhém pokusu také teplotní šok urychlil nástup infekce (obr. 7, graf B, str. 42). To by naznačovalo, že protein HSP70 by mohl napomáhat šíření virových částic, jak bylo zjištěno i v dalších modelových systémech (tab. 1., str. 16). Výjimkou, kdy množství viru bylo vyšší ve skupině nevystavené teplotnímu šoku představoval 28. den 2. pokusu (obr. 7, graf B, str. 42), což může souviset s konkrétním biologickým pokusem, jak již bylo zjištěno i v prvotních pokusech provedených v naší laboratoři [179, 180]. Důležitou roli v tom, jak teplota ovlivní průběh virové infekce v rostlinách zřejmě hrají podmínky inokulace rostliny virem, kmen inokulovaného viru, druh rostliny, vývojové stádium rostliny, fyziologický stav rostliny, délka působení teplotního stresu a také hodnota aplikované teploty.

Pro zjištění korelace mezi množstvím proteinů HSP70 a virovými částicemi PVY^{NTN} bylo ve všech skupinách rostlin detekováno množství HSP70 dvěma imunochemickými metodami, jednak na nitrocelulosové membráně a také metodou ELISA.

Oba způsoby provedení kombinovaného stresu (aplikace HS před nebo po inokulaci virem) ovlivnily průběh infekce. Teplotní šok aplikovaný na rostliny před i po inokulaci PVY^{NTN} zvyšoval množství proteinu HSP70 v obou pokusech a urychlil nástup symptomů virové infekce ve druhém pokusu. Množství proteinu HSP70 korelovalo s množstvím viru v infikovaných rostlinách (42Y, Y42 a Y20), především 22. den v prvním pokusu (obr. 8., str. 44) a 14. den ve druhém pokusu (obr. 10., str. 47).

Samotné působení teplotního šoku zvyšovalo množství proteinů HSP70 ve stresovaných rostlinách především v bezprostřední době po vystavení stresu, a to 1. hod a 1. den po aplikaci HS (obr. 9., str. 45). V rostlinách vystavených kombinovanému stresu se zvýšení HSP70 vlivem teplotního šoku může podílet na urychlení propagace virových částic. Konkrétně se protein HSP70 může podílet na syntéze virových částic a jejich šíření rostlinou.

Další možností, jak studovat interakce proteinů HSP70 s rostlinnými viry je použití molekulárně-genetických metod, např. metoda kvasinkového dvojhybridního systému (z angl. yeast two hybrid method).

Působením stresových podmínek na rostlinu dochází k metabolickým změnám. Některé metabolické dráhy rostlin jsou více aktivní, zvyšuje se syntéza látek, kterými se rostlina brání proti působení stresových podmínek, jiné metabolické dráhy jsou naopak omezeny. Teplotní šok a virová infekce ovlivňují fotosyntézu rostlin, metabolismus sacharidů a syntézu látek působících proti oxidativnímu stresu a také jiné metabolické dráhy [102, 107, 115, 130-134]. V této práci byl studován vliv působení stresových podmínek (teplotní šok, virová infekce), nebo jejich kombinace na aktivitu enzymů Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas a peroxidasy.

Enzymy Hatchova-Slackova cyklu jsou v naší laboratoři známy jako markery virové infekce PVY^{NTN} v rostlinách *Nicotiana tabacum* [137-139]. Vlivem virové infekce v rostlinách tabáku došlo ke zvýšení aktivity enzymů PEPC, NADP-ME a PPDK ve všech infikovaných skupinách rostlin (Y42, 42Y a Y20), a to především 12-28.den (obr. 11., 12., 15., str. 50, 51, 53). NADP-ME je pravděpodobně spolu s PEPC a PPDK spojen s udržováním redoxní rovnováhy v buňce pomocí poskytování redukčního ekvivalentu NADPH podílejícího se na antioxidačních mechanismech [137]. Z výsledků je patrné významné zvýšení jak ve skupině kombinovaného působení stresu (Y42, 42Y) tak samostatného (Y20). K synergickému efektu působení kombinovaného stresu však patrně nedochází vzhledem k podobně vysokým enzymovým aktivitám v infikovaných skupinách rostlin (obr. 11., 12., 15., str. 50, 51, 53, tab 5, str. 62). Regulace NADP-ME v rostlinách tabáku stresovaných PVY^{NTN} se uskutečňuje na úrovni syntézy *de novo*, zatímco regulace PEPC a PPDK probíhá pomocí fosforylace specifickými kinasami [137, 138, 182]. Jejich zapojení do signálních kaskád obranných reakcí však není známo. Samotný teplotní šok zvyšoval pouze aktivitu NADP-ME v rostlinách tabáku 1. hodinu a 1. den po aplikaci (obr. 12, str. 51). Vzhledem k tomu, že protein HSP70 se může podílet i na stabilizaci některých enzymů a u NADP-ME byla tato interakce prokázána [183], je možné, že zvýšená aktivita NADP-ME je důsledkem jeho stabilizace proteinem HSP70.

Další sledovanou skupinou enzymů byly glykosidas. Výsledky naznačují, že jak virová infekce, tak teplotního šok zvyšovaly aktivitu glykosidas v listech tabáku, přičemž teplotní šok indukoval zvýšenou aktivitu glykosidas především ihned po jeho působení (1.-3. hod, 1. den), zatímco virová infekce PVY^{NTN} až po několika dnech (obr. 16.–20. str. 55-61).

Kombinovaný stres způsobuje stejné zvýšení aktivit glykosidas jako samostatné působení stresu, opět patrně k synergickému efektu nedochází (obr. 16.–20. str. 55-61, tab. 6., 7., str. 63, 64). Vzhledem k tomu, že působením glykosidas se zvyšuje množství sacharidů v buňce, rostlina si tímto krokem pravděpodobně zvyšuje energetickou zásobu buňky. Sacharidy slouží jako důležité signální molekuly podílející se na zvýšení rezistence rostlin proti působení stresových faktorů (abiotických a biotických) [184]. V diplomové práci (Kloudová, 2012) bylo zjištěno, že biotický stres v podobě PVY^{NTN} způsoboval mírný nárůst množství glukosy, mannosy a výrazné zvýšení glukosa-6-fosfátu v rostlinách tabáku společně se zvýšením aktivit některých glykosidas. Jednalo se o aktivitu enzymu β -N-acetylhexosaminidasy a aktivitu vakuolární a extracelulární β -fruktosidasy [185].

Obecně se glykosidasy účastní hydrolýzy glykosidových vazeb v molekulách polysacharidů, glykoproteinů a dalších glykokonjugátů [150]. Katalyzují také hydrolýzu většiny hlavních glykosidových vazeb v polysacharidech buněčné stěny, čímž se podílejí na opravě buněčné stěny, na expanzi, diferenciaci a maturaci rostlinné buňky [151]. Ve stádiu senescence rostlin se zvyšuje aktivita β -glukosidasy odštěpující sacharidy buněčné stěny nebo thylakoidní membrány, z důvodu zvýšení energetické zásoby buňky [164, 169]. α -glukosidasy katalyzující hydrolýzu škrobu a maltosy také zvyšují množství monosacharidů při klíčení semen [159]. Aktivita tohoto enzymu byla nejvíce zvýšená ve skupině Y42 15.-28. den po inokulaci (obr. 16, graf A, str. 55). Enzym β -glukosidasa odštěpuje glukosu z inaktivních forem rostlinných hormonů (auxinů, kyseliny abscisové a cytokinů) a tím je aktivuje [186]. Tímto krokem může β -glukosidasa modulovat obrannou odpověď rostlin vůči stresovým faktorům. Vlivem teplotního šoku, virové infekce a také kombinace stresových faktorů došlo ke zvýšení specifické aktivity β -glukosidasy (obr. 17., str. 56).

Výsledkem působení teplotního šoku a virové infekce na rostlinu dochází ke zvýšení množství reaktivních forem kyslíku, které jsou pro rostlinu nebezpečné. Proti tomuto oxidativnímu stresu se buňka brání zvýšenou syntézou antioxidantů a antioxidačních enzymů, např. peroxidasy. Aktivita a isoenzymové složení peroxidasy bylo specificky stanoveno v gradientovém gelu po nativní elektroforéze. Ke zvýšení aktivity a změnám isoenzymového složení peroxidasy došlo vlivem virové infekce ve skupinách rostlin 42Y, Y42 a Y20 v obou biologických pokusech (obr. 21. a 22., str. 65).

Výsledky této práce naznačují, že množství dostupných proteinů HSP70 pravděpodobně ovlivňuje množství a rychlost šíření virových částic v rostlinách tabáku. Metabolická

odpověď rostlin vystavených kombinovanému působení stresových faktorů (zvýšená aktivita PEPC, NADP-ME, PPK, glykosidas a peroxidasy) se výrazně neliší od metabolické odpovědi rostlin vystavených samostatnému působení stresu. To by mohlo souviset s aktivací podobných signálních drah obranné odpovědi.

7. Závěr

- ◆ Teplotní šok (42°C, 2. hod.) aplikovaný na rostliny *Nicotiana tabacum* před nebo po inokulaci Y virem bramboru zvyšoval množství viru PVY^{NTN} a urychloval nástup infekce
- ◆ Teplotní šok zvyšoval množství proteinů HSP70 1 hod. a 1 den po aplikaci HS ve skupinách rostlin vystavených samotnému HS (K42), nebo kombinaci HS a virové infekce (42Y a Y42)
- ◆ Vlivem virové infekce došlo ke zvýšení množství proteinů HSP70 ve skupinách rostlin vystavených působení kombinovaného stresu i samotné virové infekce
- ◆ Teplotní šok zvyšoval aktivitu NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) 1. hod. po aplikaci HS
- ◆ Virová infekce a kombinace virové infekce a HS vedly ke zvýšení aktivit enzymů fosfoenolpyruvátkarboxylasy, pyruvát, fosfátdikinasy a NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační)
- ◆ V infikovaných skupinách rostlin byl detekován nárůst aktivity α -glukosidasy, β -glukosidasy, α -galaktosidasy, α -mannosidasy, β -N-acetylhexosaminidasy
- ◆ Vlivem virové infekce a kombinace teplotního šoku a virové infekce došlo ke zvýšení aktivity peroxidasy a ke změnám isoenzymového složení peroxidasy

8. Literatura

- [1] Atkinson, N. J., Urwin, P. E.: J. Exp. Bot. 63, 3523-3544 (2012)
- [2] Rizhsky, L., Liang, H. J., Shuman, J., Schulaev, V., Davletova, S., Mittler, R.: Plant Physiol. 134, 1683-1696 (2004)
- [3] Király, L., Hafez, Y. M., Fodor, J., Király, Z.: J. Gen. Virol. 89, 799-808 (2008)
- [4] Moury, B., Selassie, K. G., Marchoux, G., Daubéze, A. M., Palloix, A.: Eur. J. Plant Pathol. 104, 489-498 (1998)
- [5] Prash, C. M., Sonnewald, U.: Plant Physiol. 162, 1849-1866 (2013)
- [6] Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., Hua, J.: Mol. Plant Microbe In. 22, 498-506 (2009)
- [7] Sharma, R. C., Duveiller, E., Ortiz-Ferrara, G.: Field Crop. Res. 103, 109-118 (2007)
- [8] Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelka, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánföldi, Z., Burgyán, J.: EMBO J. 22, 633-640 (2003)
- [9] Velázquez, K., Renovell, A., Comellas, M., Serra, P., García, M. L., Pina, J. A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J.: Plant Physiol. 59, 982-990 (2010)
- [10] Byth-illing, H. A., Bornman, L.: Cell Stress Chaperon. 19, 193-203 (2014)
- [11] Diourte, M., Starr, J. L., Jeger, M. J., Stack, J. P., Rosenow, D. T.: Plant Pathol. 44, 196-202 (1995)
- [12] Mayek-Peréz, N., Garcia-Espinosa, R., Lopez-Castaneda, C., Acosta-Gallegos, J. A., Simpson, J.: Physiol. Mol Plant P. 60, 185-195 (2002)
- [13] Suleman, P., Al-Musallam, A., Menezes, C. A.: Plant Dis. 85, 80-83 (2001)
- [14] Mohr, P. G., Cahill, D. M.: Funct. Plant Biol. 30, 461-469 (2003)
- [15] McElrone, A. J., Sherald, J. L., Forseth, I. N.: Plant Dis. 85, 1160-1164 (2001)
- [16] Achuo, E. A., Prinsen, E., Hofte, M.: Plant Pathol. 55, 178-186 (2006)
- [17] English-Loeb, G., Stout, M. J., Duffey, S. S.: Oikos 79, 456-468 (1997)
- [18] Xu, P., Chen, F., Mannas, J. P., Feldman, T., Sumner, L. W., Roossinck, M. J.: New Phytol. 180, 911-921 (2008)
- [19] Beattie, G. A.: Annu. Rev. Phytopathol. 49, 533-555 (2011)
- [20] Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J. L., Grant, S. R.: Mol. Plant Microbe In. 21, 361-370 (2008)
- [21] Audebert, A., Coyne, D. L., Dingkuhn, M., Plowright, R. A.: Plant Soil 220, 235-242 (2000)
- [22] Wiese, J., Kranz, T., Schubert, S.: Plant Biol. 6, 529-536 (2004)

- [23] Sharma, Y. K., Leon, J., Raskin, I., Davis, K. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5099-5104 (1996)
- [24] Yalpani, N., Enyedi, A. J., León, J., Raskin, I.: *Planta* 193, 372-376 (1994)
- [25] Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Drzewiecka, K., Chmielowska-Bak, J., Abramowski, D., Izbińska, K.: *Planta* 239, 679-694 (2014)
- [26] Rosypal, S., Doškář, J., Petrzik, K., Růžicková, V.: *Úvod do molekulární biologie*, díl čtvrtý, Brno (2002)
- [27] Quenouille, J., Vassilakos, N., Moury, B.: *Mol. Plant Pathol.* 14, 439-452 (2013)
- [28] Chikh Ali, M., Karasev, A. V., Furutani, N., Taniguchi, M., Kano, Y., Sato, M., Natsuaki, T., Maoka, T.: *Plant Pathol.* 62, 1157-1165 (2013)
- [29] Latorre, B. A., Flores, V., Marholz, G.: *Plant Dis.* 68: 884-886 (1984)
- [30] Brantley, J. C., Hunt, A. G.: *J. Gen. Virol.* 74, 1152-1162 (1993)
- [31] Verchot, J., Koonin, E.V., Carrington, J.C. : *Virology*, 185, 527-535. (1991)
- [32] Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., Lucas, W. J.: *Virology* 237, 283-295 (1997)
- [33] Sáenz, P., Salvador, B., Simón-Mateo, C., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., García, J. A.: *J. Virol.* 76, 1922-1931 (2002)
- [34] Blanc, S., Ammar, E. D., García-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J., Pirone, T. P.: *J. Gen. Virol.* 79, 3119-3122 (1998)
- [35] Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R. V., Sun, G., Wang, A.: *Virology* 397, 56-63 (2010)
- [36] Carrington, J. C., Jensen, P., Schaad, M. C.: *Plant J.* 14, 393-400 (1998)
- [37] Fernández, A., Guo, H. S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., de Cedrón, M. G., García, J.A.: *Nucleic Acids Res.* 25, 4474-4480 (1997)
- [38] Schaad, M. C., Jensen, P. E., Carrington, J.: *EMBO J.* 16, 4049-4059 (1997)
- [39] Carrington, J. C., Dougherty, W. G.: *J. Virol.* 61, 2540-2548 (1987)
- [40] Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., Liliberté, J. F.: *J. Virol.* 74, 7730-7737 (2000)
- [41] Hong, Y., Hunt, A. G.: *Virology* 226, 146-151 (1996)
- [42] Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., Carrington, J. C.: *Virology* 206, 1007-1016 (1995)
- [43] Atreya, C. D., Raccach, B., Pirone, T. P.: *Virology* 178, 161-165 (1990)
- [44] Nagy, P. D., Pogany, J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 137-149 (2012)

- [45] Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberté, J. F., Hong, J., Nelson, R. S., Wang, A.: J. Virol. 84, 799-809 (2010)
- [46] Yamaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., Ishikawa, M.: J. Virol. 76, 2491-2497 (2002)
- [47] Matthews, R. E. F.: Plant Virology, Third Edition. Academic Press, San Diego, Londýn, (1991)
- [48] Lucas, W. J.: Virology 344 169 – 184 (2006)
- [49] Guy, C. L., Li, Q. B.: Plant Cell 10, 539–556 (1998)
- [50] Wimmer, B., Lottspeich, F., Van der Kle, I., Veenhuts, M., Gietl, C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13624–13629 (1997)
- [51] Sung, D. Y., Kaplan, F., Guy, Ch. L.: Physiol. Plantarum 113, 443-451 (2001)
- [52] Flaherty, K. M., Deluca-Flaherty, C., McKay, D. B.: Nature 346, 623–628 (1990)
- [53] Zhang, Y., Zuiderweg, E. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 10272–10277 (2004)
- [54] Mayer, M. P., Bukau B.: Cell Mol. Life Sci. 62, 670–684(2005)
- [55] Vogel, M., Bakau, B., Mayer, M. P.: Mol. Cell 21, 359-367 (2006)
- [56] Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., Craig, E. A.: Cell 101, 119–122 (2000)
- [57] Zhang, X. P., Glaser, E.: Trends Plant Sci. 7, 14-21 (2002)
- [58] Haas, I. G.: Experientia 50, 1012-1020 (1994)
- [59] Cho, E. K., Choi, Y. J.: Biotechnol. Lett. 31, 597-606 (2009)
- [60] Qi, Y., Wang, H., Zou, Y., Liu, C., Liu, Y, Wang, Y., Zhang, W.: FEBS Lett. 585, 231-239 (2011)
- [61] Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A., Beck, C. F.: Plant Cell 11, 1165-1178 (1999)
- [62] Yokthongwattana, K., Chrost, B., Behrman, S., Casper-Lindley, C., Melis, A.: Plant Cell Physiol. 42, 1389 – 1397 (2001)
- [63] Liu, C., Willmund, F., Whitelegge, J. P., Hawat, S., Knapp, B., Lodha, M., Schroda, M.: Mol. Biol. Cell 16, 1165-1177 (2005)
- [64] Liu, C., Willmund, F., Colecki, J. R., Cacace, S., Hess, B., Markert, C., Schroda, M.: Plant J. 50, 265-277 (2007)
- [65] Tsugeki, R., Nishimura, M.: FEBS Lett. 320, 198-202 (1993)
- [66] Madueno, F., Napier, J. A., Gray, J. C.: Plant Cell 5, 1965-1876 (1993)
- [67] Bonk, M., Tadros, M., Vandekerckhove, J., Al-Babili, S., Beyer, P.: Plant Physiol. 111, 931-939 (1996)

- [68] McCracken, A. A., Brodsky, J. L.: *Bioessays* 25, 868-877 (2003)
- [69] Maruyama, D., Endo, T., Nishikawa, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 107, 1684-1689 (2010)
- [70] Wakasa, Y., Yasuda, H., Oono, Y., Kawakatsu, T., Hirose, S., Takahashi, H., Hayashi, S., Yang, L., Takaiwa, F.: *Plant J.* 65, 675-689 (2011)
- [71] Park, C. J., Bart, R., Chern, M., Canlas, P. E., Bai, W., Ronald, P. C.: *PloS One* 5: e9262 (2010)
- [72] Su, P. H., Li, H. M.: *Plant Physiol.* 146, 1231-1241 (2008)
- [73] Jungkunz, I., Link, K., Vogel, F., Voll, L. M., Sonnewald, S., Sonnewald, U.: *Plant J.* 66, 983-995 (2011)
- [74] Gorovits, R., Moshe, A., Ghanim, M., Czosnek, H.: *PloS One* 8: e70280 (2013)
- [75] Mine, A., Hyodo, K., Tajima, Y., Kusumanegara, K., Taniguchi, T., Kaido, M., Mise, K., Taniguchi, H., Okuno, T.: *J. Virol.*, 86, 12091-12104 (2012)
- [76] Wang, R. Y., Stork, J., Nagy, P. D.: *J. Virol.* 83, 3276-3287 (2009)
- [77] Dufresne P. J. , Thivierge K. , Cotton S., Beauchemin C., Ide C., Ubalijoro E., Laliberté J. F., Fortin M. G.: *Virology* 374, 217-227 (2008)
- [78] Krenz, B., Windeisen, V., Wege, Ch., Jeske, H., Kleinow, T.: *Virology* 401, 6-17 (2010)
- [79] Hafren, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., Makinen, K.: *Plant Cell* 22, 523-535 (2010)
- [80] Mathioudakis, M. M., Veiga, R., Ghita, M., Tsikou, D., Medina, V., Canto, T., Makris, A. M., Livieratos, I. C.: *Virus Res.* 163, 28-39 (2012)
- [81] Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Bornke, F., Maiss, E., Sonnewald, U.: *J. Virol.* 81, 11870–11880. (2007)
- [82] Chen, Z. R., Zhou, T., Wu, X. H., Hong, Y. G., Fan, Z. F., Li, H. F.: *Mol. Plant Pathol.* 9, 809-817 (2008)
- [83] Karasev, A. V.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 293-324 (2000)
- [84] Alzhanova, D. V., Napuli, A. J., Creamer, R., Dolja, V. V.: *EMBO J.* 20, 6997-7007 (2001)
- [85] Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R.: *Mol. Plant Pathol.* 4, 383-391 (2003)
- [86] Gorovits, R., Akad, F., Beery, H., Vidavsky, F., Mahadav, A., Czosnek, H.: *Mol. Plant Microbe In.* 20, 1376-1383 (2007)

- [87] AlMaarri, K., Massa, R., AlBiski, F.: *Plant Biotechnol.* 29, 237-243 (2012)
- [88] Hu, G. J., Hong, N., Wang, L. P., Hu, H. J., Wang, G. P.: *Crop Prot.* 37, 20-25 (2012)
- [89] Maliogka, V. I., Skiada, F. G., Eleftheriou, E. P., Katis, N. I.: *Sci. Hortic-Amsterdam* 123, 280-282 (2009)
- [90] Manganaris, G. A., Economou, A. S., Boubourakas, I. N., Katis, N. I.: *Plant Cell Rep.* 22, 195-200 (2003)
- [91] Nesi, B., Trinchello, D., Lazzereschi, S., Grassotti, A., Ruffoni, B.: *Hortscience* 44, 217-219 (2009)
- [92] Robert, U., Žel, J., Ravnika, M.: *Sci. Hortic-Amsterdam* 73, 193-202 (1998)
- [93] Roggero, P., Pennazio, S.: *Physiol. Mol. Plant P.* 51, 35-40 (1997)
- [94] Tan, R., Wang, L., Hong, N., Wang, C.: *Plant Cell Tiss. Org.* 101, 229-235 (2010)
- [95] Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamaki, M., Hirata, Y., Valkonen, J. P. T.: *Mol. Plant Pathol.* 9, 237-250 (2008)
- [96] Quak, F.: *Therapy of individual plants V knize Viruses of potatoes and seed-potato production* (De Bokx, J. A. ed), Wageningen, str. 151–161 (1987)
- [97] Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P.: *Trends Biochem. Sci.* 37, 118-125 (2012)
- [98] Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F. J., Goloubinoff, P.: *Plant Cell* 21, 2829-2843 (2009)
- [99] Zhang, W., Zhou, R. G., Gao, Y. J., Zheng, S. Z., Xu, P., Zhang, S. Q., Sun, D. Y.: *Plant Physiol.* 149, 1773-1784 (2009)
- [100] Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., Yu, D.: *Mol. Cell* 29, 475-483 (2010)
- [101] Suzuki, N., Sejima, H., Tam, R., Schlauch, K., Mittler, R.: *Plant J.* 66, 844-851 (2011)
- [102] Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., Mittler, R.: *Sci. Signal* 84, ra45 (2009)
- [103] Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.: *Trends Plant Sci.* 9, 490-498 (2004)
- [104] Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., Lee, B. H.: *Proteomics* 7, 3369-3383 (2007)
- [105] Gulen, H., Eris, A.: *Plant Sci.* 166, 739-744 (2004)
- [106] Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., Singh, T. P.: *Plant Sci.* 171, 382-388 (2006)

- [107] Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., Fujita, M.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9643-9684 (2013)
- [108] Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., Mohanty, P.: *Photosynth. Res.* 98, 541-550 (2008)
- [109] Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Photorespiration and the C4 and CAM Pathways*, v knize *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth Edition, W. H. Freeman nad Company, New York, Basingstone, str. 786-791 (2008)
- [110] Marchand, F. L., Mertens, S., Kockelbergh, F., Beyens, L., Nijs, I.: *Glob. Change Biol.* 11, 2078-2089 (2005)
- [111] Gree, D. H., Weedon, M. M.: *Plant Cell Environ.* 35, 1050-1064 (2012)
- [112] Bhadula, S. K., Elthon, T. E., Habben, J. E., Helentjaris, T. G., Jiao, S. P., Ristic, Z.: *Planta* 212, 359-366 (2001)
- [113] Huang, B., Xu, C.: *J. Int. Plant Biol.* 50, 1230-1237 (2008)
- [114] Fu, J. M., Momcilovic, I., Clemente, T. E., Nersesian, N., Trick, H. N., Ristic, Z.: *Plant Mol. Biol.* 68, 277-288 (2008)
- [115] Majoul, T., Bancel, E., Triboui, E., Ben Hamida, J., Branlard, G.: *Proteomics* 4, 505-513 (2004)
- [116] Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., Guy, C. L.: *Plant Physiol.* 136, 4159-4168 (2004)
- [117] Hare, P. D., Cress, W. A., Van Staden, J.: *Plant Cell Environ.* 21, 535-553 (1998)
- [118] Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Romero, L. M.: *Plant Biol.* 6, 702-707 (2004)
- [119] Cvikrová, M., Gemperlová, L., Dobrá, J., Martincová, O., Prášil, I. T., Gubiš, J., Vanková, R.: *Plant Sci.* 182, 49-58 (2012)
- [120] Chu, T. M., Aspinall, D., Paleg, L. G.: *Aust. J. Plant Physiol.* 1, 87-97 (1974)
- [121] Song, S. Q., Lei, Y. B., Tian, X. R.: *Russ. J. Plant Physiol.* 52, 793-800 (2005)
- [122] Sakamoto, A., Muramata, N.: *Plant Cell Environ.* 25, 163-171 (2002)
- [123] Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Lopez-Lefebvre, L. R., Sanchez, E., Romero, L.: *Plant Sci.* 160, 315-321 (2001)
- [124] Larkindale, J., Vierling, E.: *Plant Physiol.* 146, 748-791 (2008)
- [125] Qin, D., Wu, H., Peng, H., Yao, Y., Ni, Z., Li, Z., Zhou, C., Sun, Qixin.: *BMC Genomics* 9, 432 (2008)
- [126] Horvath, I., Glatz, A., Varvasovzski, V., Torok, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdi, L., Benko, S., Joó, F., Vigh, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3513-3518 (1998)

- [127] Torok, Z., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovzski, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H., Vigh, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3098-3103 (2001)
- [128] Bokszzczanin, K. L., Fragkostefanakis, S.: *Front. Plant Sci.* 4, 1-20 (2013)
- [129] Cao, Y. Y., Duan, H., Yang, L. N., Wang, Z. Q., Zhou, S. C., Yang, J. C.: *Acta Agron. Sin.* 34, 2134-2142 (2008)
- [130] Synková, H., Semorádová, Š., Schnablová, R., Muller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J., Čěrovská, N.: *Plant Sci.* 171, 607-616 (2006)
- [131] Wilhelmová, N., Procházková, D., Šindelářová, M., Šindelář, L.: *Photosynthetica* 43, 597-602 (2005)
- [132] Rahoutei, J., García-Luque, I., Barón, M.: *Physiol. Plantarum* 110, 286-292 (2000)
- [133] Šindelářová, M., Šindelář, L., Burketová, L.: *Photosynthetica* 42, 431-439 (1999)
- [134] Técsi, L. I., Maule, A. J., Smith, A. M., Leegood, R. C.: *J. Exp. Bot.* 45, 1541-1551 (1994)
- [135] Shalitin, D., Wolf, S.: *Plant Physiol.* 123, 597-604 (2000)
- [136] Arias, M. C., Lenardon, S., Taleisnik, E.: *J. Phytopathol.* 151, 267-273 (2003)
- [137] Doubnerová, V., Müller, K., Čěrovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583-3598 (2009)
- [138] Müller, K., Doubnerová, V., Synková, H., Čěrovská, N., Ryšlavá, H.: *Biol. Chem.* 390, 245-251 (2009)
- [139] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čěrovská, N.: *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [140] Edwards, G. E., Franceschi, V. R., Voznesenskaya, E. V.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 173-196 (2004)
- [141] Eamens, A., Wang, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M.: *Plant Physiol.* 147, 456-468. (2008)
- [142] Apel, K., Hirt, H.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399 (2004)
- [143] Yalpani N., Silverman, P., Wilson, M. A. T., Kleier, D. A., Raskin I.: *Plant Cell* 3, 809-818, (1991)
- [144] Ding, S. W., Voinnet. O.: *Cell* 130, 413-426 (2007)
- [145] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J.: *Molecular Cell Biology Fifth Edition*, (2004)

- [146] Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedermann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B: *Biochimie* 75, 687-706 (1993)
- [147] Edreva, A.: *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31, 105-124. (2005)
- [148] Van Loon, L.C.,. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins, v knize *Pathogenesis-related proteins in plants*, (Datta, S.K., Muthukrishnan, S. ed.) Boca Raton, 1-19 (1999)
- [149] Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., Cornelissen, B.J.C.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 113-138 (1990)
- [150] Stick, R.V., Williams, S.J.: *Enzymatic Cleavage of Glycosides: Mechanism, Inhibition and Synthetic Applications*, v knize *Carbohydrates. The Essential Molecules of Life*, Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 253-280 (2009)
- [151] Franková, L., Fry, C.: *J. Exp. Bot.* 64, 3519-3550 (2013)
- [152] Frandsen, T. P., Svensson, B.: *Plant Mol. Biol.* 37, 1-13 (1998)
- [153] Yamasaki, Y., Suzuki, Y.: *Planta* 148, 354-361 (1980)
- [154] Yamasaki, Y., Konno, H.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 849-850 (1985)
- [155] Beer, E. P., Duke, S. H., Henson, C. A.: *Plant Physiol* 94, 738-744 (1990)
- [156] Sun, Z., Duke, S. H., Henson, C. A.: *Plant Physiol.* 108, 211-218 (1995)
- [157] Hebert, D. N., Foellmer, B., Helenius, A.: *Cell* 81, 425-433 (1995)
- [158] Fry, S. C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 497-520 (1995)
- [159] Stanley, D., Rejzek, M., Naested, H., Smedley, M., Otera, S., Fahy, B., Thorpe, F., Nash, R. J., Harwood, W., Svensson, B., Denyer, K., Field, R. A., Smith, A. M.: *Plant Physiol.* 155, 932-943 (2011)
- [160] Li, Y. Y., Jiang, C. J., Wan, X. C., Zhang, Z. Z., Li, D. X.: *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 37, 363-370 (2005)
- [161] Cairns, J. R. K., Essen, A.: *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3389-3405 (2010)
- [162] Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P., Spagna, G.: *Enzyme Microb. Tech.* 41, 570-575 (2007)
- [163] Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., Zacheo, G.: *Plant Sci.* 160, 795-805 (2001)
- [164] Mohapatra, P. K., Patro, L., Raval, M. K., Ramaswamy, N. K., Biswal, U. C., Biswal, B.: *Physiol. Plantarum* 138, 346-355 (2010)
- [165] Fujimoto, Z., Kaneko, S., Momma, M., Kobayashi, H., Mizuno, H.: *J. Biol. Chem.* 278, 20313-20318 (2003)

- [166] Dey, P. M., Pridham, J. B.: *Adv. Enzymol.* 36, 91-130 (1972)
- [167] Marraccini, P., Rogers, W. J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lausanne, F., Lechat, S., Pridmore, D., Petiard, V.: *Plant Physiol. Bioch.* 43, 909-920 (2005)
- [168] Soh, C. P., Ali, Z. M., Lazan, H.: *Phytochemistry* 67, 242-254 (2006)
- [169] Lee, R. H., Hsu, J. H., Huang, H. J., Lo, S. F., Chen, S. C. G.: *New Phytol.* 184, 596-606 (2009)
- [170] Gnanesh Kumar, B. S., Pohlentz, G., Mormann, M., Siva Kumar, N.: *Protein Expres. Purif.* 89, 7-15 (2013)
- [171] Kestwal, R. M., Konozy, E. H. E., Hsiao, C. D., Roque-Barreira, M. C., Bhide, S. V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 24-28 (2007)
- [172] Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Plant Physiol.* 160, 991-999 (2003)
- [173] Jagadeesh, B. H., Prabha, T. N., Srinivasan, K.: *Plant Sci.* 167, 1263-1271 (2004)
- [174] Jagadeesh, B. H., Prabha, T. N., Srinivasan, K.: *Indian J. Plant Physiol.* 11, 13-19 (2006)
- [175] Valenta, R.: Kinetické vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 57-63 (2013)
- [176] Strasser, R., Bondili, J. S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebming, E., Glossl, J., Altmann, F., Steinkellner, H., Mach, L.: *Plant Physiol.* 145, 5-16 (2007)
- [177] Conde, A., Chaves, M. M., Gerós, H.: *Plant Cell Physiol.* 52, 1583-1602 (2011)
- [178] Aparicio, F., Thomas, C. L., Lederer, C., Niu, Y., Wang, D., Maule, A. J.: *Plant Physiol.* 138, 529-536 (2005)
- [179] Fiala, M.: Vliv biotického stresu na metabolismus dusíkatých látek v rostlinách tabáku: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 56-66 (2012)
- [180] Koval'ová, T.: Vliv stresu na NADP-dependentní enzymy ve vyšších rostlinách: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 50-55 (2012)
- [181] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: NADP-dependent enzymes and abiotic stress, v knize *Abiotic Stress New Research* (Haryana, N., Punj, S., eds.) Novascience Publishers, New York, str. 57-98 (2012)
- [182] Chastain, C. J., Xu, W., Parsley, K., Sarath, G., Hibberd, J. M., Chollet, R.: *Plant J.* 53, 854-863 (2008)
- [183] Lara, M. V., Drincovich, M. F., Muller, G. L., Maurino, V. G., Andreo, C. S. *Plant Cell Physiol.* 46, 997-1006 (2005)

- [184] Morkunas, I., Ratajczak, L.: Acta Physiol. Plant 36, 1607-1619 (2014)
- [185] Kloudová, K.: Vliv biotického stresu na metabolismus sacharidů v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.): Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 47-59 (2012)
- [186] Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T., Daniell, H.: Plant Physiol. 155, 222-235 (2011)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka